

**Untersuchungen über die Lipasen
bei verschiedenen Zuchtsorten
der Raps (*Brassica napus* L.)**

Rolf Eggersmann

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Untersuchungen über die Lipasen bei verschiedenen
Zuchtsorten des Raps (*Brassica napus* L.)**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Rolf Eggersmann
München

April 1989

1. Berichterstatter: Prof.Dr.R.R.Theimer
2. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 1989

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
A. Einleitung.....	1
B. Material und Methoden.....	7
1. Pflanzenmaterial.....	7
2. Anzuchtmethoden.....	7
3. Herstellung von Gewebehomogenaten.....	7
3.1. Acetonaufschluß.....	7
3.2. Frischaufschluß.....	8
4. Fraktionierung des Rohhomogenats.....	9
4.1. Differentielle Zentrifugation.....	9
4.1.1. Auftrennung des Rohhomogenats.....	9
4.1.2. Gewinnung des ER.....	9
4.1.3. Abtrennung und Reinigung der Lipidbodies.....	10
4.1.4. Gewinnung der Lipidbodyhüllen und der lipolytischen Membranen.....	10
4.1.5. Solubilisierung der Lipase aus den Lipidbodyhüllen.....	11
4.1.6. Solubilisierung der Lipase aus Acetonpulver..	11
4.1.7. Trypsinbehandlung.....	11
4.2. Dichtegradientenzentrifugation.....	12
5. Messung der Enzymaktivität.....	12
5.1. Lipase.....	13
5.1.1. Titrimetrische Methode.....	13
5.1.2. Fluorometrische Methode.....	15
5.1.3. Colorimetrische Methode.....	16

- II -

5.1.4.	Colorimetrische Testmethode mit p-Nitrophenyl-Fettsäureester als Substrat.....	18
5.2.	Esterase.....	18
5.3.	Malatsynthase.....	19
5.4.	NADH ₂ -Cytochrom-c-Reductase.....	19
5.5.	Katalase.....	20
5.6.	Fumarase.....	20
5.7.	Isocitratlyase.....	21
5.8.	Cytochrom-c-Oxidase.....	21
6.	Proteinbestimmung.....	22
7.	Bestimmung der Saccharosekonzentration.....	22
8.	Bestimmung des Triacylglycerolgehaltes.....	22
9.	Reinigung des Sonnenblumenöls.....	23
10.	Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide und Phospholipide.....	23
11.	Bestimmung der Phospholipide.....	24
11.1.	Mineralisierung.....	25
11.2.	Phosphattest.....	25
12.	Enzymreinigung.....	25
12.1.	Reinigung der Lipase.....	26
12.1.1.	Herstellung des Rohhomogenats.....	26
12.1.2.	Ammoniumsulfatfällung.....	26
12.1.3.	Entsalzung über Sephadex G-25.....	26
12.1.4.	Chromatographie am FPLC-Gel Superose 6.....	26
12.1.5.	Hydrophobe Chromatographie.....	27
13.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	27

- III -

14.	Molekularmassenbestimmung	28
14.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	28
14.2.	Gelfiltration.....	28
C.	Ergebnisse.....	30
1.	Bestimmung der Lipaseaktivität.....	30
1.1.	Vergleich verschiedener Testmethoden.....	30
1.2.	Titrimetrischer Test.....	35
1.3.	Substratabhängigkeit.....	38
2.	Triacylglycerolgehalt und Entwicklung	41
3.	Intrazelluläre Verteilung der Lipase.....	44
3.1.	Differentielle Zentrifugation.....	44
3.2.	Bindung der Lipase an die Lipidbodies.....	48
3.3.	Fraktionierung der Lipidschicht.....	54
3.3.1.	Sorte: "Lemkes Diamant".....	54
3.3.2.	Sorte: "Akela".....	55
3.4.	Fraktionierung der Lipidbodyhüllen.....	57
3.4.1.	Sorte: "Lemkes Diamant".....	59
3.4.2.	Sorte: "Raporo".....	59
3.4.3.	Sorten: "Liragrün", "Akela" und "Petra Nova".	61
3.5.	Phospholipidzusammensetzung.....	65
3.6.	Fraktionierung des 27 000 x g Überstandes....	66
3.7.	Auftrennung der mikrosomalen Fraktion.....	68
4.	Eigenschaften der Lipasen.....	72
4.1.	Substratspezifität.....	72
4.1.1.	Hydrolyse verschiedener Triacylglycerole.....	72
4.1.2.	Hydrolyse von Tri-, Di- und Monopalmitat.....	74
4.2.	pH-Abhängigkeit	75
4.2.1.	Autolipolyse der isolierten Lipidbodies.....	81
4.3.	Effektoren	84

- IV -

4.3.1.	Einfluß von Sulfhydryl-Giften.....	84
4.3.2.	Einfluß von Salzen und Detergentien.....	86
4.4.	Hitzestabilität	92
4.5.	Temperaturabhängigkeit	92
5.	Reinigung der Lipase	94
5.1.	Homogenität der gereinigten Lipase.....	98
5.2.	Molekularmassenbestimmung	99
6.	Solubilisierung der Lipase aus den Lipid- bodyhüllen mit n-Octyl-Glucosid.....	101
6.1.	SDS-PAGE verschiedener Lipidbodyfraktionen..	102
6.2.	Isolierung der Lipidbodyhüllen mit Chloro- form/Methanol.....	105
6.2.1.	SDS-PAGE.....	105
7.	Partielle Reinigung der Lipase aus dem Ace- tonpulverextrakt.....	106
7.1.	Solubilisierung.....	106
7.2.	Gelfiltration.....	109
8.	Trypsinbehandlung.....	111
D.	Diskussion.....	113
E.	Zusammenfassung.....	128
F.	Literaturverzeichnis.....	132

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A ₂₈₀	= Absorption bei 280 nm
ALD	= Aldolase
BSA	= Rinderserumalbumin
CARB	= Carboanhydrase
CAT	= Katalase
CCR	= Cytochrom-c-Reduktase
CHAPS	= 3(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio- -1-propanesulfonate
COX	= Cytochrom-c-Oxidase
Cyt c	= Cytochrom c
D	= Dalton
DTE	= Dithioerythrit
EM	= Extraktionsmedium
ER	= Endoplasmatisches Reticulum
FER	= Ferritin
Fg	= Frischgewicht
FUM	= Fumarase
ICL	= Isocitratlyase
KD	= Kilodalton
LIP	= Lipase
M _r	= Molekularmasse
MS	= Malatsynthase
p-CMPS	= p-Chloromercuriphenylsulfonsäure
p-HMB	= p-Hydroxymercuribenzoat
PL	= Phospholipide
RH	= Rohhomogenat
S ₂	= 27 000 x g Sediment
S ₃	= 130 000 x g Sediment
SDG	= Saccharosedichtegradient
SDS-PAGE	= SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
U ₂	= 27 000 x g Überstand

A. Einleitung

Ölsamen lagern in ihren Speichergeweben Triacylglycerole ab, um bei der Keimung daraus Kohlenstoffskelette und Energie zu gewinnen, die zum Wachstum des Keimlings sowie zum Aufbau des Photosyntheseapparates in den ergrünenden Kotyledonen benötigt werden (Stumpf, 1976). In solchen fettspeichernden Zellen des Endo- oder Perisperms bzw. der Kotyledonen aller bislang untersuchten Ölsamen werden diese Reservefette in sogenannten Lipidbodies abgelagert, die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen einen Durchmesser von 0.5-2.0 μm aufweisen. Diese sphärischen Granula verschmelzen weder in der Zelle noch nach Isolierung in wässrigem Medium, was darauf schließen läßt, daß sie von einer hydrophilen Hülle umgeben sind. In der Tat wurde im Elektronenmikroskop eine membranartige Struktur entdeckt, welche die Organellen umgibt. Sie bildet sich im hochauflösenden Elektronenmikroskop im Gegensatz zur Elementarmembran nicht als Dunkel-hell-dunkel-Struktur ab, sondern stellt sich als einzelne dunkle Linie dar. Diese Hülle wird als "half-unit-membrane" bezeichnet, da sie offensichtlich aus einer einschichtigen Phospholipidschicht besteht, deren hydrophobe Ketten offenbar im Speicher-

fett verankert sind (Altschul et al., 1964; Yatsu et al., 1971; Yatsu und Jacks, 1972; Wanner und Theimer, 1978; Slack et al., 1980; Wanner et al., 1981). Die vorliegenden Analysen der "Hüllen" entfetteter Lipidbodies zeigen, daß sie Phospholipide enthalten, wobei als Hauptkomponenten Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol (Donaldson, 1976; Moreau und Huang, 1980) auftreten; sie stellen 5-15% des Gesamtlipidgehaltes der Lipidbodies dar. Neben Phospholipiden besitzen die Lipidbodyhüllen 3-5% Protein pro Lipidbodyfraktion (Sturm et al., 1985). In der denaturierenden SDS-Gelelektrophorese gereinigter Lipidbodyhüllen unterscheidet sich das Proteilmuster von dem der Membranen des Endoplasmatischen Reticulums, der Glyoxysomen und Mitochondrien. Lipidbodyhüllen aus Kotyledonen von *Sinapis alba* L., *Cucumis sativus* und *Cucumis melo* L. enthalten im Stadium des Fettabbaus 4-9 verschiedene Hauptproteine in einem Molekulargewichtsbereich von 13 bis 100 KD, wobei ein Protein mit der Masse von 90 KD als Marker der Lipidbodyhüllen genutzt wurde (Sturm et al., 1985). Nach der Samenruhe wird offenbar die Neusynthese dieses Proteins am auffälligsten induziert (Bergfeld et al., 1978; Roughan und Slack, 1982; Sturm et al., 1985; Hermann, 1987).

Die Biogenese dieser Fettspeicherstrukturen mit ihrer einzigartigen, begrenzenden Hülle erfolgt im Verlauf der Samenreifung. Trotz intensiver Untersuchungen sind die Mechanismen der Lipidbodyentstehung heute noch umstritten. Durch neuere biochemische Untersuchungen ist erwiesen, daß die Synthese der Triacylglycerole im ER abläuft (Stymne und Stobart, 1984; Stymne und Stobart, 1985; Stobart et al., 1986; Qu et al., 1986). Für deren Ablagerung in den allgemein verbreiteten Lipidbodies

wurden bislang zwei Vorstellungen entwickelt:

- (1) Die Fette werden vor der Speicherung ins Cytosol abgegeben. Dort bilden sich, durch Verschmelzung winziger Öltröpfchen, die Lipidbodies, die anschließend von einer Phospholipidhülle umgeben werden (Rest und Vaughan, 1972; Smith, 1974; Bergfeld et al., 1978; Stobart et al., 1986; Qu et al., 1986; Herman und Shannon, 1984; Greenwood und Chrispeels, 1985). Dabei sollen umhüllende ER-Membranen eine Rolle als Phospholipidlieferanten spielen, wobei unklar ist, wie die Phospholipide vom ER zu den Lipidbodies gelangen.
- (2) Die Lipidbodies entstehen durch Einlagerung neu synthetisierter Triacylglycerole in die lipophile Mittelschicht der Elementarmembranen des ER. Sie schnüren sich dann nach Erreichen ihrer kritischen Größe ab, wobei Teile des ER (sogenannte Appendices) an den Lipidbodies zurückbleiben können. Die Lipidbodies selbst sind so von einer ursprünglich von der ER-Membran herrührenden Phospholipidschicht umschlossen (Schwarzenbach, 1971; Wanner et al., 1981).

In den reifen Samen der meisten Ölsaaten sind die Zellen des Speichergewebes (Kotyledonen, Endosperm) prall gefüllt mit Lipidbodies (Bergfeld et al., 1978; Wanner, 1978); daneben enthalten sie einige Proteinbodies und wenige Stärkekörner. Zu Beginn der Keimung werden zunächst die Proteine, dann die Fette hydrolysiert. Der Abbau sowie die Umwandlung der Triacylglycerole in Kohlenhydrate sind innerhalb weniger Tage weit-

gehend abgeschlossen. Demgemäß tritt nach der Imbibition des Samens als eine der ersten Enzymaktivitäten Lipase auf; sie katalysiert die Hydrolyse der Triacylglycerole in Glycerol und freie Fettsäuren. Im gleichen Zeitraum erscheinen in diesen Geweben die Aktivitäten jener Enzymsysteme, welche die Gluconeogenese aus den Spaltprodukten der Fette katalysieren. Dazu gehören vor allem die in Glyoxysomen lokalisierten Stoffwechselwege, nämlich die β -Oxidation der Fettsäuren und der Glyoxylsäurezyklus (Gerhardt und Beevers, 1970; Tolbert, 1971), wobei für einige dieser Enzyme bereits erwiesen ist, daß sie während der Anfangsstadien der Keimung neu synthetisiert werden (Smith et al., 1974; Riezman et al., 1980; Hock und Gietl, 1982; Lutzenberger, 1985). Dementsprechend beobachtet man in EM-Aufnahmen einen engen räumlichen Kontakt zwischen Glyoxysomen und Lipidbodies. Die Lipidbodies werden offensichtlich von Glyoxysomen umflossen, wobei ihr Inhalt teilweise in glyoxysomalen Invaginationen abgebaut wird, was einen effizienten Übertritt der freigesetzten Fettsäuren in die glyoxysomale Matrix ermöglicht (Gruber et al., 1970; Wanner et al., 1982). Somit bieten die ersten Schritte der Fettmobilisierung einen Angriffspunkt für innere und äußere Regulationsvorgänge. So sind z.B. hormonelle Einflüsse und Temperatureinwirkungen auf die Aktivität des Enzyms Lipase bereits von verschiedenen Autoren beschrieben worden (Taverner und Laidman, 1972; Marriot und Northcote, 1975; Somolenska und Lewak, 1974).

Der Mechanismus der Hydrolyse der Reservelipide ist bis dato für *Ricinus communis* (Ory et al., 1971; Moreau und Huang, 1980; Lin et al., 1982; Maeshima und Beevers, 1985), *Zea mays* (Lin et al., 1973; Lin und Huang,

1984), *Arachis hypogaea* (Muto und Beevers, 1974; Huang und Moreau, 1978; Bligny und Douce, 1978), Gerste (Baxter, 1984), Reiskleie (Aizono et al., 1976) sowie *Brassica napus* (Theimer und Rosnitschek, 1978; Rosnitschek und Theimer, 1980; Lin und Huang, 1983) näher untersucht.

Im *Ricinus*-Endosperm treten zwei Tri-, Di- und Monoacylglycerol spaltende Lipasen mit optimaler Aktivität im sauren bzw. im alkalischen Bereich auf. Während die im Sauren aktive Lipase mit den Lipidbodies assoziiert zu sein scheint (Ory et al., 1968; Muto und Beevers, 1974), liegt die "alkalische Lipase" als integraler Bestandteil der Glyoxysomenmembran vor (Maeshima und Beevers, 1985). Im Scutellum der Samen von *Zea mays* tritt dagegen offenbar nur eine Lipase auf; sie ist mit der Lipidbodyhülle assoziiert und entfaltet ihre optimale Hydrolyse bei pH 7.5 (Lin und Huang, 1984). Ebenso zeigten Muto und Beevers (1974), daß bei *Arachis hypogaea* nur eine "alkalische Triacylglycerollipase" vorliegt, die mit der glyoxysomalen Membran assoziiert ist. Nicht bekannt ist dagegen die genaue Topologie der Gerstenlipasen. Man weiß jedoch, daß membrangebundene Enzyme vorliegen, die in der Hauptsache aus dem Embryo und aus dem Endosperm isoliert wurden. Ebenso ist die genaue subzelluläre Lokalisation und physiologische Bedeutung der Reiskleielipasen ungeklärt (Aizono et al., 1976).

In den Kotyledonen von *Brassica napus* fanden Rosnitschek und Theimer (1978, 1980) eine nur im Alkalischen wirkende Triacylglycerollipase, die mit einer sogenannten lipolytischen Membranfraktion assoziiert ist, deren Sedimentationsverhalten im Saccharose-Dichtegradienten sich von dem der Membranen des ER deutlich unterschei-

det. Diese Membranfraktion enthält jedoch Strukturen, die morphologische Merkmale von Appendices von Lipidbodies aufweisen (Wanner und Theimer, 1978; Rosnitschek und Theimer, 1980). Die in dieser lipolytischen Membranfraktion gemessene Lipaseaktivität reicht sowohl quantitativ als auch qualitativ aus, um für den Fettabbau im Gewebe verantwortlich zu sein. Lin und Huang (1983) fanden in einer anderen Rapssorte dagegen eine in der Lipidbodyhülle, lokalisierte Triacylglycerole abbauende Lipase, deren optimaler Wirkungsbereich im Sauren bei einem pH von 6.5 liegt.

Nachdem die bisherigen Erkenntnisse über die Lipasen selbst bei Sorten von *Brassica napus* zum Teil recht widersprüchlich sind, sollten in der vorliegenden Arbeit Verlauf der Entwicklung und Eigenschaften der Lipasen während der Keimung bei verschiedenen handelsüblichen Rapssorten charakterisiert werden. Besonderes Interesse galt ihrer intrazellulären Lokalisation. Schließlich sollte eine Reinigung der Triacylglycerollipase aus einer Rapssorte versucht werden. Da in der Literatur für die Messung der lipolytischen Aktivität der Lipase einige mehr oder weniger spezifische Testverfahren beschrieben sind, sollten die für die gestellten Aufgaben geeigneten Meßmethoden optimiert werden.

B. M a t e r i a l u n d M e t h o d e n

1. Pflanz en m a t e r i a l:

Folgendes Saatgut wurde in den Untersuchungen verwendet:

- *Ricinus communis* L. var: "Hale"
- *Brassica napus* var.: "Raporo", "Lifura", "Petra Nova", "Lemkes Diamant", "Akela" (erucasäurefrei), "Liragrün", (erucasäurefrei).

2. A n z u c h t m e t h o d e n

Die Samen wurden entweder in einer 2%igen Natriumhypochloritlösung oder in einer 0.3%igen Chinosollösung 20 min oberflächensterilisiert, anschließend mit Leitungswasser gewaschen und auf feuchtem Vermiculit ausgesät. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank bei 28°C im Dunkeln und einer relativen Feuchtigkeit von 80-100%. Als Zeitpunkt Null der Keimung wurde der Augenblick der Aussaat der Samen festgelegt.

3. H e r s t e l l u n g v o n G e w e b e h o m o g e n a t e n

3.1. A c e t o n a u f s c h l u ß

Die Kötyledonen der im Dunkeln gewachsenen Keimlinge der jeweiligen Rapssorten wurden am Tag ihrer höchsten lipolytischen Aktivität sorgfältig mit destilliertem

Wasser gewaschen, 10 min bei -18°C vorgekühlt und mit einem Ultraturrax (Typ T 45 N) in Aceton (-18°C) zerkleinert. Der Niederschlag wurde abgenutscht, mit eiskaltem Aceton nachgewaschen und im Lyophilisator (WKF 205) getrocknet. Das Acetonpulver wurde zum Gebrauch entweder im Extraktionsmedium mit 30 mmol/l Tricin, pH 7.5 oder ohne Puffer rehydratisiert und die Suspension durch sechslagige Gaze filtriert; ihr pH-Wert wurde danach mit Kalilauge auf pH 7.5 eingestellt, worauf sie bei 20 000 x g 20 min lang zentrifugiert wurde. Das Sediment wurde in Extraktionsmedium resuspendiert.

3.2. Frischaufschluß

Die Rapskotyledonen wurden gründlich in destilliertem Wasser gewaschen, abgetrocknet und anschließend das Frischgewicht bestimmt. Zur Homogenisierung wurde dann das Pflanzenmaterial vorgekühlt und alle weiteren Arbeitsgänge bei $0-5^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Das Material wurde mit einer Rasierklinge in einer Reibschale zerkleinert und anschließend mit dem Pistill zerrieben, bis ein möglichst homogener Brei entstanden war. Je Gramm Frischgewicht wurden 2-3 ml Extraktionsmedium (0.15 mol/l Tricin bzw. 0.03 mol/l Tricin, pH 7.5; 0.5 mol/l Saccharose, 0.01 mol/l KCl, 0.001 mol/l EDTA, 0.001 mol/l MgCl_2 ; 1 mg/ml DTE) sowie 100 mg Polyclar/Gramm Frischgewicht zugegeben. In einigen Versuchen wurde der Rohextrakt statt mit Tricin mit 2 mol/l KOH auf pH 7.5 gehalten. Das Homogenat wurde anschließend durch 6 Lagen Gaze gepreßt und zur Abtrennung von Zelltrümmern 15 min lang bei 480 x g in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5B) zentrifugiert. Die Fettschicht wurde im Überstand resuspendiert, das Sediment verworfen. Der Über-

stand mit Fettschicht wird im folgenden als Rohhomogenat (RH) bezeichnet.

4. Fraktionierung des Rohhomogenats

Eine weitere Fraktionierung des Rohhomogenats wurde durch differentielle Zentrifugation und Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

4.1. Differentielle Zentrifugation

4.1.1. Auftrennung des Rohhomogenats

Das Rohhomogenat wurde durch eine 30-minütige Zentrifugation bei $27\ 000 \times g$ in Fettschicht, Überstand (U_2) und Sediment (S_2) fraktioniert. Die Fettschicht wurde sorgfältig abgehebert und im Extraktionsmedium resuspendiert. Das Sediment, das sich aus Mitochondrien, Plastiden, Glyoxysomen sowie wenigen anderen Partikeln zusammensetzt, wurde ebenfalls im Extraktionsmedium resuspendiert und wird im folgenden als Rohpartikelfraktion bezeichnet.

4.1.2. Gewinnung des ER

Der Überstand (U_2) wurde 3 Stunden bei $130\ 000 \times g$ zentrifugiert (Beckman U2 Spinco L2-B Rotor "50 Ti"). Die resultierende mikrosomale Fraktion, Sediment (S_3) wurde einer 3-stündigen SDG-Zentrifugation unterworfen (15-45% Saccharose, 1 mmol/l EDTA). Der Gipfel der Cytochrom-c-Reductaseaktivität tauchte ungefähr bei 32%

Saccharose auf. Die Fraktionen zwischen 30 und 36% Saccharose wurden gesammelt und eingengt.

4.1.3. Abtrennung und Reinigung der Lipidbodies

Dazu wurden Rapskotyledonen sehr vorsichtig in Extraktionsmedium (15% Saccharose) homogenisiert und das gewonnene Homogenat durch Gaze gepreßt. Das Filtrat wurde mit 5%iger Saccharose (w/w) überschichtet und in der Sorvall RC-5B Zentrifuge 30 min bei 27 000 x g flo-
tiert. Die Fettschicht wurde abgehebert und in Extraktionsmedium resuspendiert.

4.1.4. Gewinnung der Lipidbodyhüllen und der lipolytischen Membranen

Die so gereinigten Lipidbodyfraktionen wurden dreimal mit peroxidfreiem Diethylether entfettet. Nach Zentrifugation bei 1000 x g wurde der Etherextrakt von der wässrigen Phase und der Etherschicht abgesondert. Der verbleibende Rest an Diethylether wurde aus den Fraktionen mit Stickstoff ausgeblasen. Der Etherextrakt wurde einer 1-stündigen Zentrifugation von 130 000 x g unterworfen, wobei die Hüllen der Lipidbodies sedimentieren. Eine weitere Methode, die Lipidbodyhüllen zu gewinnen, war die mehrmalige Extraktion der gereinigten Fettfraktion mit Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 (Bergfeld et al., 1980).

4.1.5. Solubilisierung der Lipase aus den Lipidbodyhüllen

Die Lipidbodyhüllen wurden in Extraktionsmedium aufgenommen und 1 Stunde in einem mittleren Schwerfeld von 130 000 x g zentrifugiert, um lösliche Proteine abzutrennen. Das erhaltene Sediment wurde in nichtionischem Detergenz n-Octyl-Glucosid (40 mmol/l) eine Stunde bei ungefähr 0-4°C inkubiert und anschließend erneut einer 130 000 x g Zentrifugation für eine Stunde ausgesetzt. Der resultierende Überstand enthielt die solubilisierete Lipase.

4.1.6. Solubilisierung der Lipase aus Acetonpulver

Zur Solubilisierung der Lipase aus dem Acetonpulverextrakt wurde dieser mit 40 mmol/l n-Octyl-Glucosid bzw. mit 5 mmol/l CHAPS im Extraktionsmedium eine Stunde bei ungefähr 0-4°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1-stündige Zentrifugation bei 20 000 x g bzw. 130 000 x g. Das 20 000 x g Sediment des acetongefällten Rohhomogenats, es wird als Acetonpulversediment bezeichnet, enthielt die solubilisierete Lipase.

4.1.7. Trypsinbehandlung

Die Proteolyse der lipolytischen Membranfraktion und des Acetonpulvers wurde mit Trypsin bei 26°C durchgeführt, entsprechend den Zeitintervallen inkubiert und die Proteolyse mit Trypsininhibitor gestoppt. Kontrollen

ohne Trypsin wurden den gleichen Behandlungen unterzogen.

4.2. Dichtegradientenzentrifugation

In Zentrifugenbechern (37 ml Inhalt) wurden kontinuierliche Saccharosedichtegradienten errichtet, indem auf 3 ml 60%iger (w/w) Saccharoselösung ein aus 13 ml 60%iger (w/w) Saccharoselösung und 14 ml 20%iger (w/w) Saccharoselösung im Gradientenmixer gemischter Gradient aufgeschichtet wurde, was einem Dichtebereich von etwa 1.081 kg/l-1.286 kg/l (20°C) entspricht. Auf solche Gradienten wurden vorsichtig 4-5 ml der jeweiligen Fettschicht geschichtet, die sich in ca. 17%iger Saccharoselösung befand. Die mikrosomale Fraktion wurde über einen linearen SDG (28 ml) von 15-45% Saccharose aufgetrennt, um gereinigte Membranen des ER zu erhalten. Nach 15 Stunden Zentrifugation dieser Gradienten in der Beckman Ultrazentrifuge mit dem Ausschwingrotor SW 27 bei 62 000 x g oder nach 45-minütiger Zentrifugation im Vertikalrotor (SV 288, Sorvall RC-5B) bei 40 300 x g wurden die Gradienten in einem LKB-Fraktionssammler fraktioniert.

5. Messung der Enzymaktivitäten

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Messungen spektralphotometrisch mit einem Kontron Uvicon 810 bei Raumtemperatur durchgeführt.

traschall emulgiert, anschließend mit 0.01 mol/l NaOH auf pH 11 eingestellt, nochmals emulgiert, mit 1 mol/l HCl auf pH 9 eingestellt und mit CO₂-freiem, destilliertem Wasser auf 100 ml gebracht, was einer Endkonzentration des Trioleins von 56 mmol/l entspricht.

Das Enzymtestgemisch enthielt:

				Konz.im Test
Trioleinemulsion	(56 mmol/l)	5.0 Anteile	28.0	mmol/l
Desoxycholat	(10 mmol/l)	0.5 Anteile	0.5	mmol/l
NaCl	(0.89 %)	4.5 Anteile	0.45	%

Der Testansatz enthielt 2.0 ml Trioleinemulsion. Die Reaktion wurde durch 0.02-0.5 ml Enzymlösung gestartet. Das Testgemisch wurde zunächst durch Zugabe von NaOH genau auf den gewünschten pH-Wert gebracht (in der Regel pH = 9). Erst als die Probe die Temperatur von 37°C hatte und die Zugabe von Titrationsflüssigkeit aus der Bürette gleichmäßig erfolgte, wurde der Verbrauch an 0.01 mol/l NaOH fortlaufend registriert. Es genügte, den Verbrauch an 0.01 mol/l NaOH 5-10 min lang aufzuzeichnen. Oberhalb eines Verbrauchs von 100 µl Titrationsflüssigkeit pro Minute wurde weniger Enzymlösung in den Test eingesetzt.

Berechnung der Lipaseaktivität:

1 ml des Titranten enthält die Stoffmenge $n=0.01$ mmol. Das entspricht 10 µmol freigesetzter Fettsäure.

$$\text{Lipaseaktivität} = 0.167 \frac{(V_2 - V_1)}{\Delta t} \quad (\text{nkat/ml})$$

V_1 = Summe des Verbrauchs an 0.01 mol/l NaOH, die durch nicht enzymatische und durch endogene Säurebildung verursacht wird (µl).

V_2 = Gesamtverbrauch an 0.01 mol/l NaOH bei komplettem Testansatz (µl).

Δt = min

5.1.2. Fluorometrischer Test

(Nach Guilbault und Hiesermann, 1969; Muto und Beevers, 1974)

Die Fluoreszenz erfolgte bei 37°C(±1) mit einem Ependorf-Fluorophotometer (Primärfilter Hg 405-430 nm; Sekundärfilter mit Durchlaßbereich von 470-3000 nm).

Das Testgemisch (2 ml Endvolumen) enthielt im Standardansatz:

Glycin/NaOH	pH 9.0 - 11.0	0.1	mol/l
oder Tris/HCl	pH 7.0 - 9.0	0.1	mol/l
oder Imidazol/HCl	pH 6.0 - 7.0	0.1	mol/l
oder Succinat/HCl	pH 4.0 - 6.0	0.1	mol/l
oder Citrat/HCl	pH 2.0 - 4.0	0.1	mol/l
Dithioerythrit		4.0	mmol/l
N-Methyloxymyristat		0.5	mmol/l
Enzymlösung			

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats (50µl einer Lösung von N-Methylindoxylmyristat in Ethylenglycolmonomethylether) gestartet und die Zunahme der Fluoreszenz drei Minuten lang verfolgt.

Der molare Fluoreszenzkoeffizient von N-Methylindoxol beträgt $1 \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

5.1.3. Colorimetrische Testmethode

(Nixon und Chan, 1979)

In dieser Methode werden die durch die Lipase freigesetzten Fettsäuren in Form ihrer Kupfersalze mit 1.5-Diphenylcarbazid als Kupfernachweisreagenz bestimmt. Als Substrate wurden Triolein (Fa. Serva), Trierucin (Fa. Sigma), Trilinolein (Fa. Sigma), Tri-, Di- und Monopalmitat (Glycerin-1-monopalmitat, Fa. Sigma) und Sonnenblumenöl (Fa. Schneekoppe) verwendet.

Zur Herstellung der jeweiligen Substratemulsion wurde eine Mischung aus 250 mg Triolein bzw. 303 mg Trierucin bzw. 251 mg Trilinolein bzw. 229 mg Tripalmitat bzw. 162 mg Dipalmitat bzw. 94 mg Monopalmitat (in einem geringen Volumen Chloroform gelöst) und 0.25 g Gummi arabicum (Merck, DAB 7, fein gepulvert) und 5 ml 0.89% NaCl mit Ultraschall 30 s lang emulgiert.

Um das Chloroform aus der Emulsion zu entfernen, wurde sie 10 min mit Stickstoff gespült. Die "Endkonzentration" der Triacylglycerol-Emulsion betrug 57 mmol/l.

Der Testansatz enthielt in 1 ml Endvolumen:

Glycin/NaOH	pH 9.0 - 11.0	0.1 mol/l
oder Tris/HCl-Puffer	pH 7.0 - 9.0	0.1 mol/l

oder Imidazol/HCl	pH 6.0 - 7.0	0.1 mol/l
oder Succinat/HCl	pH 4.0 - 6.0	0.1 mol/l
oder Citrat/HCl	pH 2.0 - 4.0	0.1 mol/l
Dithioerythrit		4.0 mmol/l
Substratemulsion		28.0 mmol/l
Enzymlösung		

Das Reaktionsgemisch wurde 30-120 min lang bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 6 ml eines Gemisches aus Chloroform : n-Heptan : Methanol (CHM, 4:3:2, v/v) zu 0.1 ml Probe gestoppt.

Nach 3-minütigem Schütteln wurden 2 ml Phosphatpuffer und 0.8 ml einer 100 mmol/l H_3PO_4 -Lösung zugegeben, um einen pH-Wert 2.0 zu erreichen. Nach einer Zentrifugation bei 2500 Upm in einer Tischzentrifuge wurde die Wasser-Methanolphase abgesaugt, ohne die darunter liegende Phase zu stören. Nach Zugabe von 1 ml 0.01 mol/l HCl-Lösung mit anschließender Zentrifugation von 3 min wurde die wässrige Phase abgesaugt und 2 ml Kupferreagenz (0.1 mol/l $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 mol/l Triethanolamin, 0.06 mol/l NaOH und 36 g NaCl/100 ml; pH 8.1) zugegeben. Nach wiederum 3-minütigem Schütteln und Zentrifugation wurde die organische Phase in ein frisches Reagenzglas übertragen und 0.2 ml Farbreagenz (10 ml 0.4% 1.5.-Diphenylcarbazon in absolutem Ethanol plus 0.1 ml 1 mol/l Triethanolamin) zugegeben. kräftig geschüttelt und 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die Absorption wurde bei 550 nm gegen einen Blindwert (3 ml CHM + 0.2 ml Farbreagenz) gemessen. Zur Ermittlung der Konzentration der Fettsäuren wurde eine Eichkurve mit einer Palmitinsäurestandardlösung erstellt.

5.1.4. Colorimetrische Testmethode mit p-Nitrophenyl-Fettsäureester als Substrat

(Nach Desnuelle und Savary, 1963; Sadar und Ayranci, 1987)

Das Testgemisch (1 ml Endvolumen) enthielt im Standardansatz:

Tris/HCl-Puffer	pH 8.5 bzw. 9.0	0.09 mol/l
p-Nitrophenyl-Fettsäureester		1.0 mmol/l
Enzymlösung		

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats (50 µl einer frischen Lösung von p-Nitrophenyl-Fettsäureester in Ethylenglycolmonomethylether) gestartet und die Anfangsrate der Bildung von p-Nitrophenol bei 405 nm im Spektralphotometer verfolgt. Der Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol beträgt $18.8 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

5.2. Esterase

(Carboxylic-esterhydrolase EC 3.1.1.1.)

(Desnuelle und Savary, 1963; Sadar und Ayranci, 1978)

Das Testgemisch (1 ml Endvolumen) enthielt im Standardansatz:

Tris/HCl-Puffer	pH 8.5 bzw. 9.0	0.09 mol/l
p-Nitrophenylacetat		1.0 mmol/l
Enzymlösung		

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats (50 µl einer frischen Lösung von p-Nitrophenylacetat in Ethylenglycolmonomethylether) gestartet und die Anfangsrate der Bildung von p-Nitrophenol bei 405 nm im Spektral-

photometer verfolgt. Der Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol beträgt $18.8 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

5.3. Malatsynthase

(L-Malate: Glyoxylate:Lyase(CoA-acetylating),
E.C.4.1.3.2.) (Dixon und Kornberg, 1959)

Der Testansatz von 1 ml Endvolumen enthielt:

Tris/HCl-Puffer	pH 8.0	0.1	mol/l
Magnesiumchlorid		5.0	mmol/l
Acetyl-CoA		0.1	mmol/l
Natriumglyoxylat		3.3	mmol/l
Enzymlösung			

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glyoxylat gestartet und bei 212 nm verfolgt. Eine Extinktionsabnahme von $E = 0.1$ entspricht 9.35 nmol/l freigesetztem CoA.

5.4. NADH₂-Cytochrom-c-Reductase

(NADH₂ : Ferricytochrome-c(Fe^{3+})-Oxydoreductase,
E.C.1.6.2.a), (Lord et al., 1973)

Das Testgemisch enthielt in 1 ml Endvolumen:

Phosphatpuffer	pH 7.2	0.032	mmol/l
Cytochrome-c, oxidiert		0.5	g/l
NADH ₂		0.211	mmol/l
NaCN		5.0	mmol/l
Enzymlösung			

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Cytochrom-c ge-

startet und dessen Reaktion bei 550 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient beträgt $28.4 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

5.5. Katalase

(H_2O_2 : H_2O_2 -Oxidoreduktase, E.C.1.11.1.6.)

(Lück, 1965)

Der Testansatz in 1 ml Endvolumen enthielt:

Phosphatpuffer	0.1	mol/l
H_2O_2	10.0	mmol/l

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl Enzymlösung gestartet und die Anfangsrate der H_2O_2 -Zersetzung bei einer Meßstrahlung von 240 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient beträgt $3.9 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

5.6. Fumarase

(L-Malate-hydrolyase, E.C.4.2.1.2.)

(Racker, 1950)

Der Testansatz in 1 ml Endvolumen enthielt:

Tricin/NaOH-Puffer	pH 7.5	0.1	mol/l
Malat		2.5	mmol/l
Triton X-100		0.1	g/l
Enzymlösung		20.0	μl

Die Bildung von Fumarat wurde bei 240 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient beträgt $2.44 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

5.7. Isocitratlyase

(Threo-D₅-Isocitrate-Glyoxylate-Lyase, E.C.4.1.3.1.)

(Dixon und Kornberg, 1959)

Im Testansatz (1 ml) waren enthalten:

Phosphatpuffer	pH 7.4	85.0 mmol/l
Magnesiumchlorid		5.0 mmol/l
DTE		4.0 mmol/l
Phenylhydrazoniumchlorid		10.0 mmol/l
threo-D ₅ -Isocitrat		7.0 mmol/l
Enzymlösung		

Die Reaktionsgemisch wurde 5-10 min vorinkubiert und anschließend bei 324 nm die Bildung des Glyoxylat-Phenylhydrazons verfolgt. Der Extinktionskoeffizient ist $1.7 \times 10^7 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

5.8. Cytochrom-c-Oxidase

(Ferrocytochrom-c-oxygen-oxidoreduktase, E.C.1.9.3.1.)

(Nach Schnarrenberger et al., 1971).

Der Testansatz (1 ml) enthielt:

Phosphatpuffer	pH 7.0	50.0 mmol/l
Cytochrom-c, reduziert		1.5 mmol/l
Digitoninlösung		0.01 %
Enzymlösung		

Enzym- und Digitoninlösung wurden zunächst 1 min vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion gestartet und die Oxidation des Cytochrom-c bei 550 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient ist $78.7 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

6. Proteinbestimmung

(Bradford, 1976)

Protein wurde mit "Bio-Rad-Protein Dye Reagent Concentrate" im Micro-Assay-Verfahren bestimmt. Eine Proteineichkurve wurde mit einer eingestellten Rinderserumalbuminlösung ermittelt. In Proben aus den SDG, bei der Gelfiltration und der hydrophoben Interaktionschromatographie erfolgte die Proteinbestimmung durch Messung der Absorption bei 280 nm.

7. Bestimmung der Saccharosekonzentration

Die Saccharosekonzentration wurde durch Messung des refraktiven Index in einem geeichten Refraktrometer (Fa. Atigo) bestimmt und die jeweilige Dichte einer Eichtablette (Fa. Isco) entnommen.

8. Bestimmung des Triacylglycerolgehaltes

(Modifiziert nach Wahlefeld, 1974)

Die Bestimmung erfolgte mit der "Test-Combination Triacylglycerole, vollenzymatisch" (Boehringer Mannheim, GmbH).

Lösung 1 enthält: ATP, Tris pH 7.2, MgSO_4 , Triton X-100, Cholsäure, PEP, NADH, Lipase, Esterase, PK, LDH.

Lösung 2 enthält: Glycerokinase

In eine Küvette (3 ml) wurden einpipettiert:

Lösung 1 2.50 ml

Probenmaterial 0.05 ml

Nach der Mischung wurde das Testgemisch 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert und dann die Extinktion gegen 340 nm gemessen (E_1). Dann wurde 0.01 ml Glycerokinase zugegeben und 10 min danach die Extinktion (E_2) bei 340 nm ermittelt. Aus der Extinktionsdifferenz und den Extinktionswerten des Reagenzleerwertes (E_{RL}) ($\Delta E = E_1 - E_2 - E_{RL}$) wurde die Konzentration der Triacylglycerole berechnet.

9. Reinigung des Sonnenblumenöls

(Nach Crider et al., 1964)

Käufliches Sonnenblumenöl enthält neben Tri- auch 1-2% Diacylglycerole und Spuren von Monoacylglycerolen. Die Triacylglycerole aus dem Sonnenblumenöl wurden durch Säulenchromatographie über Silicagel G (Fa. Merck) gereinigt. Die gereinigte Präparation war eine klare, nahezu farblose Flüssigkeit. Ihre Auftrennung mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ergab, daß nur Triacylglycerole vorlagen.

10. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide und Phospholipide

(Nach Stahl, 1967; Skipsi und Barclay, 1969; Rouser, 1969)

Die Lipide wurden in Chloroform/Methanol (1 : 2 v/v)

1 Stunde extrahiert, mit 2 mol/l KCl gewaschen und mit Stickstoff eingengt. Jeweils 50µl der einzelnen Proben wurden punktförmig auf Dünnschichtplatten (Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 mm, Fa. Merck) aufgetragen und bei Raumtemperatur chromatographiert. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Petrolether (40-60°C) : Diethylether : Eisessig (70 : 30 : 2, v/v). Ein Lipid-Standard (Fa. Sigma) aus einem Gemisch gleicher Mengen, bestehend aus Monoolein, Diolein (85% 1.3.-isomer und 15% 1.2.-isomer) und Triolein wurden mitchromatographiert.

Bei der Bestimmung der Phospholipide wurden als Referenzsubstanzen L-α-Phosphatidylethanolamin, L-α-Phosphatidylcholin (aus Ei), L-α-Phosphatidylserin (Bovine brain), L-α-Phosphatidylglycerol (aus Ei), L-α-Phosphatidylinositol (Sojabohnen), Phosphatidsäure und Diphosphatidylglycerol verwendet (Fa. Sigma). Die Trennung der Phospholipide erfolgte in einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie (DC-Kieselgel 60, Schichtdicke 0.25 mm, Fa. Merck). Als Laufmittel für die erste Dimension wurde Chloroform : Methanol : Eisessig : Wasser (170:30:20:7, v/v) verwendet. Vor dem Lauf in der zweiten Dimension wurde das Chromatogramm 1-2 Stunden getrocknet. Als Laufmittel für die zweite Dimension wurde $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_3$ -Lösung (conc.) (65:35:5, v/v) eingesetzt.

Die getrockneten Platten wurden mit Joddampf behandelt. Dadurch wurden die Lipide und Phospholipide als gelbbraune Flecken sichtbar.

11. Bestimmung der Phospholipide

(Nach Petitou, Tuy und Rosenfels, 1978)

Der Phospholipidgehalt der Proben wurde nach deren

Mineralisierung durch Bestimmung der Phosphatkonzentration ermittelt.

11.1. Mineralisierung

Gleiche Mengen der auf dem Kieselgel sichtbar gemachten Phospholipide wurden abgekratzt und mit konzentrierter Schwefelsäure drei Stunden bei 250°C in einem Heizblock mineralisiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit wenigen Tropfen 30%igem H_2O_2 entfärbt, anschließend mit Wasser verdünnt und überschüssiges H_2O_2 mit Na_2SO_3 (16.5%, w/w) reduziert. Bei jedem Versuchsansatz lief eine Blindprobe mit entsprechender Menge an Silicagel ohne Phospholipid mit.

11.2. Phosphattest

In den zu testenden Proben wurde Ammoniumheptamolybdat (2.86×10^{-3} mol/l) gegeben und anschließend Malachitgrün (18.5 mg in 1%igem Polyvinylalkohol) zugefügt. Nach 20 Minuten wurde die Lichtabsorption bei 623 nm bestimmt. Bei jedem Versuchsansatz wurden 3 Blindwerte mit 0, 100, 200 nmol/l KH_2PO_4 ebenso wie die Proben behandelt und daraus die Menge an organischem Phosphat bestimmt.

12. Enzymreinigung

Sämtliche Schritte der Enzymreinigung wurden bei 0-4°C ausgeführt.

12.1. Reinigung der Lipase

12.1.1. Herstellung des Rohhomogenats (RH)

Von drei Tage alten, im Dunkeln gewachsenen Rapskeimlingen der Sorte "Petra Nova" wurden ca. 300 g Kotyledonen geerntet, sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen, mit einem Ultraturrax in Extraktionsmedium zerkleinert und ein RH hergestellt (Punkt 3.2.).

12.1.2. Ammoniumsulfatfällung

Das Rohhomogenat wurde bis zu 40% mit Ammoniumsulfat gesättigt. Dazu wurden 0.243 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{ml}$ unter dauerndem Rühren zugegeben und nach erfolgtem Zusatz wurde das RH eine Stunde lang weitergerührt. Das Präzipitat wurde anschließend bei 20 000 x g abzentrifugiert, in 20 mmol/l Tris/HCl, pH 8.0, 200 mmol/l NaCl resuspendiert und erneut 10 min bei 20 000 x g zentrifugiert, um die löslichen Proteine abzutrennen.

12.1.3. Entsalzung über Sephadex G-25

Der Überstand wurde über eine Sephadex G-25 Säule (10 x 2.6 cm) entsalzt, um die lipolytische Aktivität im titrimetrischen Test bestimmen zu können.

12.1.4. Chromatographie am FPLC-Gel Superose 6

Um eine Verstopfung des Superosegels zu vermeiden, wurde der entsalzte Überstand erneut 20 min bei 20 000

x g zentrifugiert und anschließend durch einen Proteinmembranfilter (0.25µm, Fa. Millipore) durchgepreßt. Die FPLC-Säule (24 ml) war mit 20 mmol/l Tris/HCl, pH 8.0, in 200 mmol/l NaCl equilibriert. Die Laufgeschwindigkeit betrug 0.5 ml/ min. Das Eluat wurde in Fraktionen von 0.5 ml gesammelt. Da maximal nur 0.5 ml an Volumen aufgetragen werden konnte, erfolgten mehrere Durchläufe. Die lipasereichsten Fraktionen wurden über PD-10 Säulen auf 10 mmol/l Tris/HCl, pH 7.0, in 200 mmol/l NaCl umgepuffert, in einer Verdampfungszentrifuge (Univapoconcentrator UVC 150H) eingeeengt und auf die Octyl-Sepharose-Säule aufgetragen.

12.1.5. Hydrophobe Chromatographie

Die Säule (11 x 2.6 cm) war mit 45 ml Octyl-Sepharose CL 4B gefüllt und mit 10 mmol/l Tris/HCl, pH 7.0 und 0.2 mol/l NaCl equilibriert. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 22 ml/h. Die Elution erfolgte zuerst mit 10 mmol/l Tris/HCl, pH 7.0, dann mit 25 mmol/l n-Octyl-Glucosid in 10 mmol/l Tris/HCl, pH 7.0. Es wurden Fraktionen mit 4 ml Volumen gesammelt und auf Lipaseaktivität untersucht.

13. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine geschah entweder in 10%-igem Polyacrylamidgel mit 0.1% SDS oder in einem nach Mirault und Scherrer (1971) hergestellten exponentiellen Acrylamid-Gradient von 5-25%. Die Herstellung des Obergels, des Kammerpuffers und die Probenvorbehandlung wurden nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Auftren-

nung der Proben erfolgte bei 200 V und dauerte 3 Stunden. Die Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau geschah nach Weber und Osborne (1969).

14. Molekularmassenbestimmung

14.1. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Das Enzymprotein wurde im Laemmli-Puffer eine Minute gekocht und auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen. BSA, Phosphorylase, Myosin, Ovalbumin und Carbanhydrase (Fa. Serva) dienten als Referenzproteine. Auftrennung, Färbung und Entfärbung erfolgten wie in Punkt 12. dargestellt. Anschließend wurde die Laufstrecke der Proteine gegen den Logarithmus der Molekularmassen aufgetragen.

14.2. Gelfiltration

Die Molekularmasse der Lipase wurde durch Gelfiltration über das FPLC-Gel Superose 6 (24 ml) ästimiert. Die Säule war mit 20 mmol/l Tris/HCl, pH 8.0, 0.2 mol/l NaCl equilibriert. Als Eichsubstanzen wurden Ferritin, Catalase, Aldolase, BSA, Ovalbumin, Carbanhydrase und Cytochrom-c eingesetzt. Das Ausschlußvolumen wurde mit Dextranblau bestimmt. Der Verteilungskoeffizient, definiert als

$$K_{av} = \frac{V_E - V_0}{V_T - V_0}$$

V_T = Gesamtvolumen der Gelpackung,
 V_E = Elutionsvolumen,
 V_0 = Ausschlußvolumen

wurde gegen den Logarithmus der Molekularmassen aufgetragen.

C. E r g e b n i s s e

1. Bestimmung der Lipaseaktivität

1.1. Vergleich verschiedener Testverfahren

Das Problem der Charakterisierung, Klassifizierung und der meßtechnischen Unterscheidung der Enzyme, die zur Gruppe der Carboxylesterhydrolasen (EC 3.1.1.) gehören, wird besonders im Fall der Lipasen (Triacylglycerolacylhydrolasen, EC 3.1.1.3.) offenkundig. Um das Problem praktisch zu lösen, betrachtet man die Lipase als Enzym, das emulgierte Triacylglycerole langkettiger Fettsäuren hydrolysiert, unabhängig davon, ob es auch gegenüber typischen Esterasesubstraten aktiv ist (Junge, 1984). Aus diesen Gründen existieren keine spezifischen Testverfahren zur Bestimmung der Lipaseaktivität. Bei einigen dieser Meßmethoden werden nach Substratspaltung die entstehenden Produkte durch Titration, Colorimetrie oder Fluorometrie bestimmt.

Um letztlich die Verteilung der lipolytischen Aktivitäten nach differentieller Zellfraktionierung der

Kotyledonen verschiedener Rapssorten bestimmen zu können, wurden zunächst in den folgenden Untersuchungen die Ergebnisse mehrerer Testmethoden zur Bestimmung der Lipaseaktivität miteinander verglichen: eine kontinuierliche titrimetrische (Rick, 1969; Hockeborn und Rick, 1982; Junge, 1984), zwei colorimetrische (Desnuelle und Savary, 1963; Nixon und Chan 1979) und eine fluorometrische Testmethode (Guilbault und Hiesermann, 1969).

Zusätzlich wurde bei der titrimetrischen Methode neben dem in vielen klassischen Arbeiten als Substrat eingesetzten Sonnenblumenöl auch das synthetische Trioleoylglycerol überprüft, das eine biochemisch definierte Zusammensetzung aufweist, während natürliches Sonnenblumenöl sich aus 95.6% Triacyl-, 2% Diacylglycerolen, 0.1% Fettsäuren und 2.3% anderen Verbindungen wie Sterolestern, Phospho- und Glycolipiden zusammensetzt (D'Alonzo et al., 1982). Um nur die Spaltung der Triacylglycerole im Sonnenblumenöl durch die Lipase zu erfassen, wurden die Triacylglycerole über Silicagel G nach der Methode von Crider et al. (1964) isoliert.

In den Testmethoden von Desnuelle und Savary (1963) und Guilbault und Hiesermann (1969) werden künstliche Substrate für die Lipase verwendet, die ähnliche lipophile Eigenschaften wie natürliche Monoacylglycerole langkettiger Fettsäuren besitzen und demzufolge von allen Hydrolasen gespalten werden können, die Triacylglycerole (Hayase und Tappel, 1970; Muto und Beevers, 1974; Rosnitschek und Theimer, 1980), Diacyl- und Monoacylglycerole (Huang und Moreau, 1978) sowie Phospho- bzw. Galactolipide (Hasson und Laties, 1976) hydrolysieren können.

Tab.1: Enzymaktivitäten gereinigter käuflicher Lipase aus *Aspergillus rhizopus* mit natürlichen und künstlichen Substraten. pH = 9.0

Testmethode	Substrat	spez. Aktivität (nkat/mgP)
titrimetrisch	Sonnenblumenöl	112.0 ± 4
titrimetrisch	Trioleoylglycerol	5.1 ± 1
colorimetrisch	Sonnenblumenöl	123.7 ± 5
colorimetrisch	p-Nitrophenylmyristat	239.4 ± 8
fluorometrisch	N-Methylindoxylmyristat	131.3 ± 3

Tab.2a: Vergleich verschiedener Testmethoden. Lipolytische Enzymaktivitäten des Acetonpulverextraktes aus Kotyledonen 3 Tage alter Rapskeimlinge. Sorte "Petra Nova". pH = 9.0

Testmethode	Substrat	spez. Aktivität (nkat/mgP)
titrimetrisch	Sonnenblumenöl	1.0 ± 0.2
titrimetrisch	Trioleoylglycerol	3.7 ± 0.5
colorimetrisch	Sonnenblumenöl	0.6 ± 0.3
colorimetrisch	p-Nitrophenylmyristat	20.3 ± 0.9
fluorometrisch	N-Methylindoxylmyristat	9.7 ± 4.0

Tab.2b: Lipolytische Enzymaktivitäten des 27 000 x g Überstandes aus Kotyledonen 3 Tage alter Rapskeimlinge der Sorte "Petra Nova". pH = 9.0

Testmethode	Substrat	spez. Aktivität (nkat/mgP)
titrimetrisch	Sonnenblumenöl	2.2 ± 1.0
titrimetrisch	Trioleoylglycerol	4.8 ± 0.4
colorimetrisch	Trioleoylglycerol	2.5 ± 1.0
colorimetrisch	p-Nitrophenylmyristat	28.9 ± 2.0
fluorometrisch	N-Methylindoxylmyristat	15.9 ± 5.0

Tab.2c: Lipolytische Enzymaktivitäten des 27 000 x g Überstandes aus Kotyledonen 4 Tage alter Rapskeimlinge der Sorte "Lemkes Diamant". pH = 9.0

Testmethode	Substrat	spez. Aktivität (nkat/mgP)
titrimetrisch	Sonnenblumenöl	21.9 ± 14.0
titrimetrisch	Trioleoylglycerol	30.1 ± 5.0
colorimetrisch	Trioleoylglycerol	25.9 ± 6.0
colorimetrisch	p-Nitrophenylmyristat	80.1 ± 4.0
fluorometrisch	N-Methylindoxylmyristat	46.2 ± 10.9

In weiteren Vorversuchen wurde anstatt der *Aspergillus*-Lipase Rapslipase aus frisch geernteten Kotyledonen der Sorten "Petra Nova" und "Lemkes Diamant" und aus lyophilisiertem Acetonpulver der Varietät "Petra Nova" verwendet.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, zeigt die gereinigte

Aspergillus-Lipase mit den Substraten Sonnenblumenöl und dem künstlichen Substrat N-Methyloxy-myristat vergleichbare Aktivitäten, mit p-Nitrophenylmyristat zeigt sie die höchste, mit Triolein die geringste spezifische Aktivität.

Die Höhen der lipolytischen Aktivitäten, mit der colorimetrischen und der titrimetrischen Methode bestimmt, liegen sowohl im Acetonpulverextrakt als auch im Rohhomogenat von Rapskotyledonen der Sorte "Petra Nova" in vergleichbarer Größenordnung (Tab. 2a, 2b). Auch bei der Varietät "Lemkes Diamant" werden Triolein und Sonnenblumenöl unabhängig vom Testverfahren mit ähnlicher Aktivität umgesetzt, jedoch sind die lipolytischen Umsatzraten wesentlich höher als bei "Petra Nova" (Tab. 2c).

Diese apparenten Aktivitätsunterschiede beruhen wahrscheinlich auf einer unterschiedlichen Substratspezifität der Lipasen in den verschiedenen Cultivaren und können als erster Hinweis auf eine Varietätenspezifität verstanden werden.

Die gereinigte *Aspergillus*-Lipase hydrolysiert im Gegensatz zu den ungereinigten Lipasen der Cultivare "Petra Nova" und "Lemkes Diamant" N-Methyloxy-myristat mit größerer Umsatzrate. Im Vergleich zu Triolein und Sonnenblumenöl werden die künstlichen Monoester der Myristinsäure auch von den getesteten Rapslipasen bevorzugt gespalten. Mit p-Nitrophenylmyristat zeigen sie die höchste spezifische Aktivität, wobei neben Lipasen auch unspezifische Acylhydrolasen an der Hydrolyse beteiligt sein dürften.

Deshalb wurden im angewendeten titrimetrischen bzw. colorimetrischen Test Triacylglycerole eingesetzt, die von unspezifischen Esterasen, wie sie vermutlich in allen Pflanzenzellen vorkommen, nicht gespalten werden

können. Zudem sind Lipasen von Diacylglycerol- und Monoacylglycerolhydrolasen unterscheidbar.

Ein weiterer Vorteil vor allem des kontinuierlichen titrimetrischen pH-Stat-Tests besteht darin, daß die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse des Substrats gemessen werden kann, während bei der colorimetrischen Methode nach Nixon und Chan (1979) längere Inkubationszeiten von 30-90 Minuten notwendig sind. Vorzug der colorimetrischen Methode ist, daß im sauren Milieu im Gegensatz zur pH-Stat-Technik auch geringe lipolytische Enzymaktivitäten erfaßt werden können.

Beim Nachweis lipolytischer Enzymaktivitäten in den Zellhomogenaten und -fraktionen muß demnach je nach Fragestellung das entsprechende Testverfahren angewendet werden. Aus diesen Gründen wurden für die weiteren Untersuchungen vornehmlich die titrimetrische und die colorimetrische Methode nach Nixon und Chan (1979) mit Triolein als definiertem Substrat für Triacylglycerollipasen verwendet.

1.2. Titrimetrischer Test

Erst bei einer Freisetzung von 2.5×10^{-3} nmol Hydroniumionen im Testansatz wird eine pH-Verschiebung bei der hier verwendeten Titrationsausrüstung der Fa. Radiometer registriert. Dabei können jedoch nicht alle Protonen der freigesetzten Fettsäuren erfaßt werden, da im sauren Bereich die Dissoziation geringer ist, und eine etwaige unspezifische Bindung der Fettsäuren an Emulgatoren und Proteine erfolgen kann.

Tabelle 3 und 4 geben Aufschluß über die prozentuale Erfassung der zur Substratemulsion zugegebenen Protonenkonzentration in Form von Ölsäure.

Tab.3: $c(\text{Ölsäure}) = 0.01 \text{ mol/l}$ $pK_s = 6.0$
 $\text{pH-Wert der Substratemulsion} = 6.5$

H^+ -Zugabe nmol	Dissoz.grad 75.9 %	H^+ erfaßt nmol	% der erfaßbaren Protonen
2000	1518.0	0	0
2500	1897.5	240	13
3500	2656.5	790	30
5000	3795.0	2280	60

Tab.4: $c(\text{Ölsäure}) = 0.01 \text{ mol/l}$ $pK_s = 6.0$
 $\text{pH-Wert der Substratemulsion} = 9.0$

H^+ -Zugabe nmol	Dissoz.grad 99.9 %	H^+ erfaßt nmol	% der erfaßbaren Protonen
250	249	260	104.0
500	499	493	98.7
750	749	797	106.4
1000	999	1220	122.1

Bei einem pH-Wert von 6.5 liegt Ölsäure ($pK_s=6.0$) zu 75.9% dissoziiert in Form ihrer konjugierten Base Oleat vor. Davon können, bei einer Zugabe von 2.5 μmol Ölsäure im pH-Stat-Test, 13% erfaßt werden. Bei Zugabe von 5.0 μmol Ölsäure zur Substratemulsion werden schon 60% der freien Protonen registriert. Wird der pH-Wert auf 8.0 gebracht, so dissoziiert die Ölsäure zu 99% und

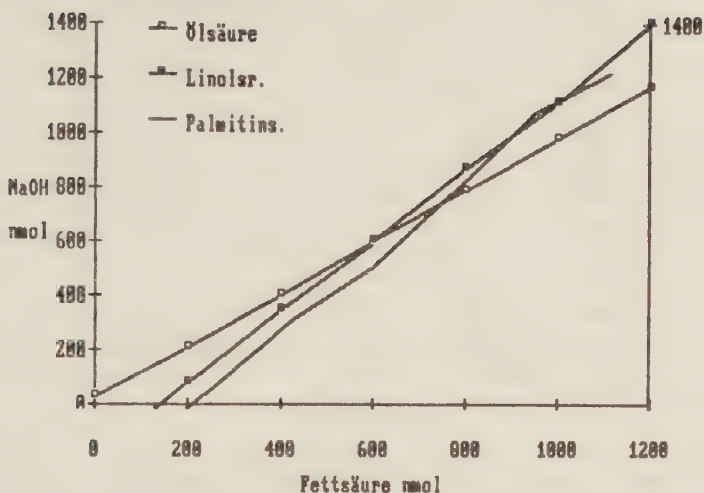


Abb.1: pH-Stat-Titration von Öl-, Palmitin- ($pK_s = 5.7$) und Linolsäure, $c(\text{Fettsäuren}) = 0.01 \text{ mol/l}$ in $c(\text{Trioleinemulsion}) = 28 \text{ mmol/l}$, $c(\text{NaOH}) = 0.01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 9.0$

bei einem pH-Wert von 9.0 liegt sie zu 99.9% als Oleat vor. In einem Bereich von pH 8-9 kann somit die gesamte Menge der bei einer enzymatischen Hydrolyse freigesetzten Hydronium-Ionen erfaßt werden (Abb. 1).

Um die Aussagekraft der titrimetrischen Methode im sauren Bereich testen zu können, wurde *Ricinus communis* als Testobjekt benutzt, da es im Endosperm je eine "alkalische" und eine "saure" Lipase besitzt. Die "saure" Lipase (pH-Optimum 5; Ory et al., 1962; Muto und Beevers, 1974) ist mit der Hülle der Lipidbodies assoziiert und zeigt während der ersten 3 Tage der Keimung ihre höchste Aktivität. In Abb. 2 konnte dieser Umstand mit der titrimetrischen Methode bestätigt werden. Als

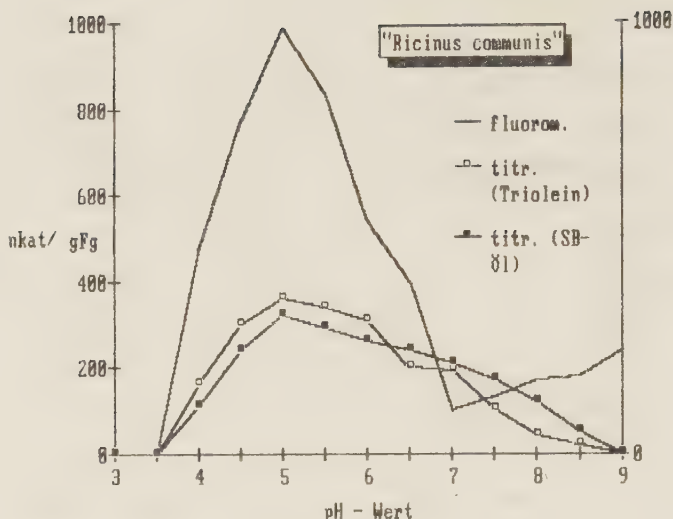


Abb. 2: pH-Abhängigkeit der lipolytischen Enzymaktivität in der Fettfraktion von *Ricinus communis* (Alter: 2 Tage). Fluorometrischer Test: N-Methylindoxylmyristat
 Titrimetrischer Test: Sonnenblumenöl und Triolein als Substrate

Kontrolle wurde zusätzlich der empfindliche fluorometrische Test verwendet.

Diese Resultate zeigen, daß größere lipolytische Aktivitäten im sauren Bereich auch mit der pH-Stat-Technik erfaßt werden können. Zu bedenken ist jedoch, daß bei einem pH von 5.0 nur rund 10% der Fettsäuren dissoziiert vorliegen.

1.3. Substratabhängigkeit

Ebenso wie bei Verwendung des künstlichen Substrats N-Methylindoxylmyristat (Abb. 3) im fluorometrischen

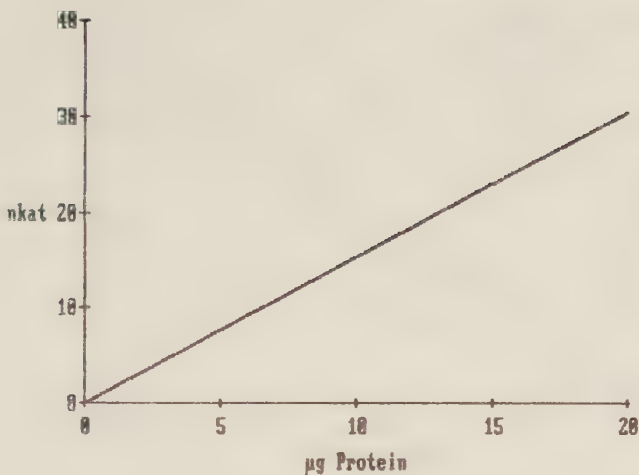


Abb.3: Abhängigkeit der katalytischen Aktivität vom eingesetzten Protein. Sorte: "Lemkes Diamant". Fluorometrischer Test, Substrat: N-Methylindoxylmyristat 0.5 mmol/l, pH = 9.0

Test ergab sich mit Sonnenblumenöl, Trierucin und Triolein als Substrat im kontinuierlichen titrimetrischen Test ein geradliniger Zusammenhang zwischen eingesetztem Protein und gemessener katalytischer Aktivität der Lipase aus der Rapsorte "Lemkes Diamant" (Abb. 4) und *Aspergillus rhizopus* (Abb. 5).

Aus Abbildung 4 geht zusätzlich hervor, daß die katalytische Umsatzrate bei Triolein und Sonnenblumenöl über der von Trierucin, dem eigentlichen natürlichen Substrat von Raps, liegt. Auch im colorimetrischen Test nach Nixon und Chan (1979) zeigte sich eine lineare Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom eingesetzten Protein. Als Enzym wurde zum einen käufliche Lipase aus *Aspergillus rhizopus* (Abb. 5) und zum anderen Lipase aus der Varietät "Liragrün" verwendet (Abb. 6).

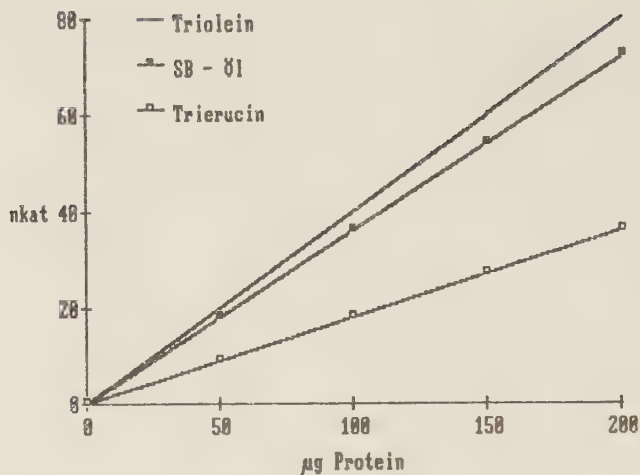


Abb.4: Abhängigkeit der katalytischen Aktivität vom eingesetzten Protein. Sorte: "Lemkes Diamant" Kontinuierlicher titrimetrischer Test mit Triolein, Trierucin und Sonnenblumenöl als Substrat, $c(\text{Substrat}) = 28 \text{ mmol/l}$

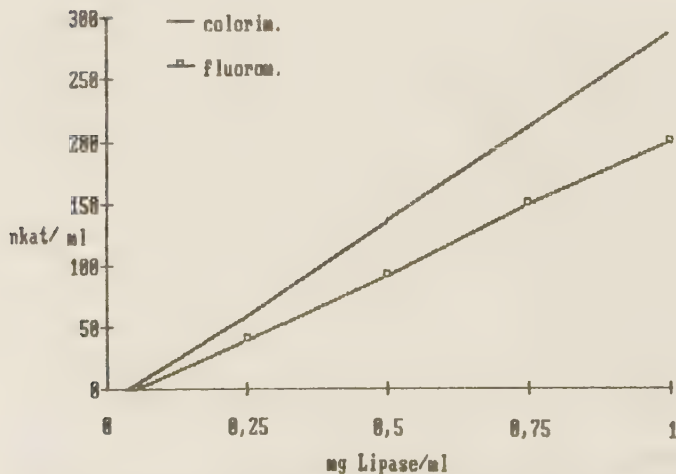


Abb.5: Abhängigkeit der katalytischen Aktivität vom eingesetzten Protein. pH = 9.0 Lipase aus *Aspergillus rhizopus*

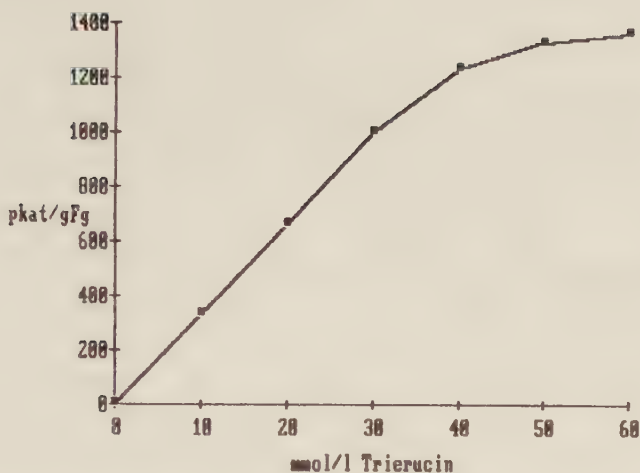


Abb.6: Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Trierucin-konzentration. Sorte: "Liragrün" Colorimetrischer Test pH = 9.0

2. Triacylglycerolgehalt und Enzymentwicklung

Die Kotyledonen zwei Tage alter Rapskeimlinge enthalten ungefähr 40-50% Triacylglycerole. In den ersten 3 Tagen ist die geringste Abnahme des Fettgehaltes bei allen getesteten Cultivaren zu beobachten. Ab Tag 3 bis Tag 6 erfolgt die stärkste Lipolyse mit 11-25 mg pro Tag und mg Fg je nach Zuchtvarietät (Abb. 7). Der Fettabbau ist ferner bei allen untersuchten Sorten mit dem Ansteigen der lipolytischen Aktivität korreliert. Während des ersten Keimungstages ist keine Lipaseaktivität meßbar. Dann erfolgt ein rascher Anstieg bis Tag 3 bei "Petra Nova", bis Tag 4 bei "Raporo" und "Lemkes Diamant", bei "Akela" und "Lifura" dagegen ein relativ langsamer Anstieg, wobei deren Maxima erst am Tag 5

erreicht werden. Danach nimmt die Lipaseaktivität bis zum Tag 7 unterschiedlich schnell wieder ab (Abb. 8). Der Entwicklungsverlauf der Lipaseaktivitäten folgt praktisch dem Schlüsselenzym des Glyoxylsäurezyklus, der Isocitratlyase, die ihre maximale Aktivität, je nach Sorte, am 3. bis zum 5. Tag nach Keimungsbeginn entfaltet (Abb. 9). Die jeweilige apparente Lipaseaktivität der getesteten Rapsvarietäten ist wesentlich höher als es für den endogenen Fettabbau notwendig wäre. Bei maximaler lipolytischer Aktivität ist die *in vitro* gemessene Lipolyse der untersuchten Cultivare 140-345 mal größer als die *in vivo* ablaufende Hydrolyse der Neutralfette (Tab. 5).

Tab.5: Vergleich des Abbaus von Triacylglycerolen *in vivo* und die maximale Triacylglycerolhydrolyse *in vitro* (Substrat: Triolein)

Sorte	maximale Lipaseakt. nkat/gFg (37°C)	maximale Fettabbaurate mg Fett/gFgxTag	<i>in vivo</i> Fettabbau mg Fett/gFgxTag (20°C)
Akela	52.0	1321.2	8.6
Lemkes D.	117.0	2972.8	8.6
Lifura	48.5	1232.3	5.7
Petra N.	67.0	1702.4	12.1
Raporo	82.5	2096.2	10.9

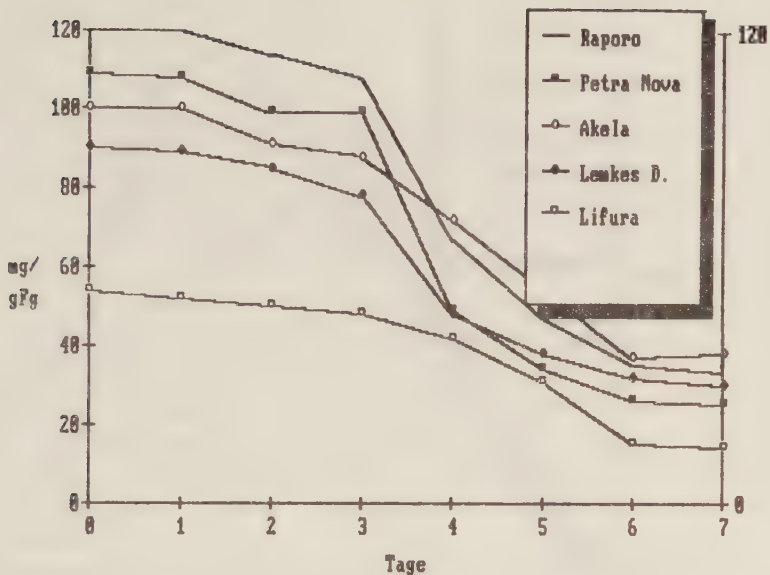


Abb.7: Änderung des Triacylglycerolgehaltes aller untersuchten Varietäten im Verlauf der Keimung

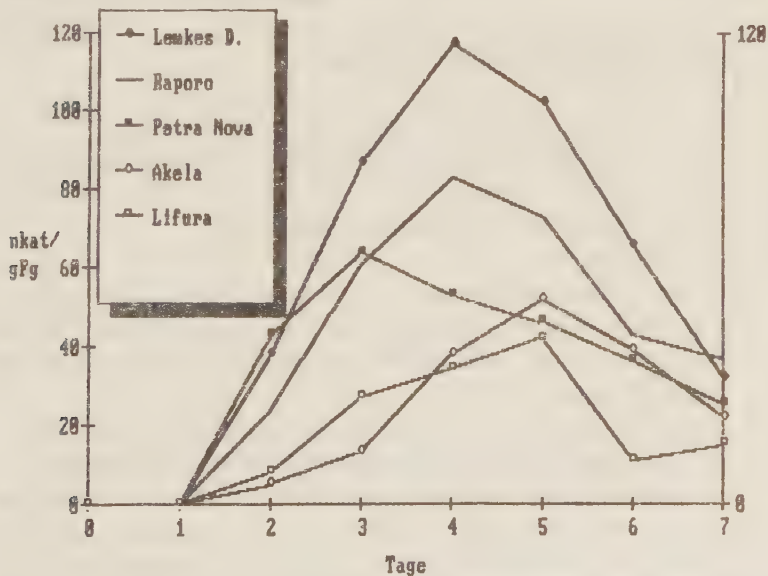


Abb.8: Verlauf der Entwicklung der Lipaseaktivitäten der verschiedenen Sorten während der Keimung

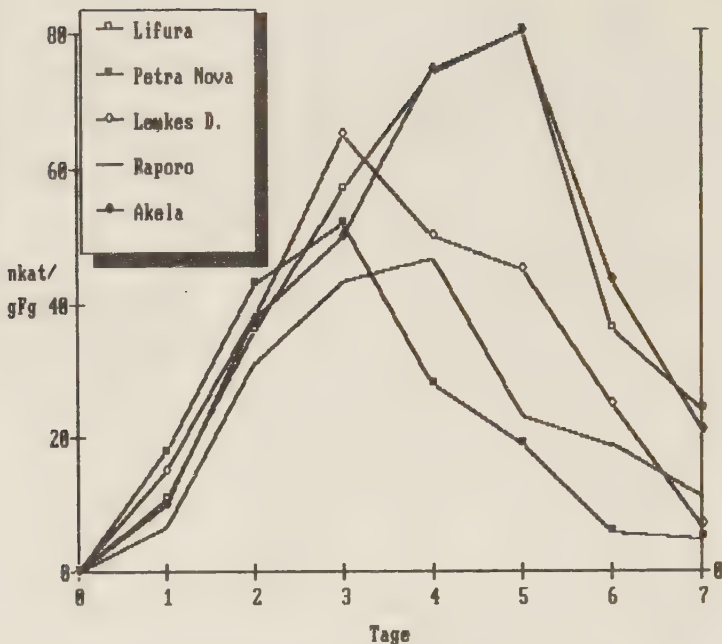


Abb.9: Verlauf der Entwicklung der ICL-Aktivitäten der verschiedenen Rapssorten während der Keimung

3. Intrazelluläre Verteilung der Lipase

3.1. Differentielle Zentrifugation

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß die Verteilung der lipolytischen Aktivitäten bei "Raporo" von der Konzentration des Tricinpuffers im Extraktionsmedium abhängt (Sommer, 1979).

Im folgenden sollte überprüft werden, ob dies als ein allgemeines Prinzip auch für andere Rapssorten gilt.

Rohhomogenate der Kotyledonen 4 Tage alter etiolierter Rapskeimlinge der Sorten "Lemkes Diamant" und "Raporo" wurden durch Zentrifugation differentiell fraktioniert. In den so abgetrennten Zellfraktionen wurde die Lipaseaktivität bestimmt.

Tab.6a: Verteilung der Lipaseaktivitäten nach Zentrifugation von Rohhomogenaten etiolierter Rapskeimlinge der Sorte "Lemkes Diamant" bei 27 000 x g (100 % = Summe der Aktivitäten im Überstand, Rohpartikelfraktion und Fettschicht)
Titrimetrischer Test pH = 9.0

Tricin/KOH	0 mmol/l	30 mmol/l	150 mmol/l
Fraktion	% der Gesamtaktivität		
Fettschicht	70.1 ± 5	50.4 ± 13	18.8 ± 1
Überstand	19.9 ± 1	40.7 ± 11	75.1 ± 3
Rohpartikel- fraktion	10.0 ± 6	9.1 ± 3	6.2 ± 2

Tab.6b: Prozentuale Verteilung der Lipaseaktivität in den Zellfraktionen. Sorte: "Raporo" pH = 9.0

Fraktion	titrimetrisch		colorimetrisch	
	30 mmol/l	150 mmol/l	30 mmol/l	150 mmol/l
	Tricin-Puffer		Tricin-Puffer	
Fett	32.3 ± 14	4.6 ± 1	34.3 ± 9	2.0 ± 0
Überstand	52.4 ± 18	74.6 ± 13	56.9 ± 10	79.4 ± 7
Sediment	15.3 ± 3	20.8 ± 9	8.8 ± 7	14.7 ± 4

Wie aus den Tabellen 6a und 6b hervorgeht, findet sich bei den Sorten "Lemkes Diamant" und "Raporo" in

der Tat bei niedriger Pufferkonzentration in der Fettschicht ein höherer Anteil an Lipaseaktivität als bei erhöhter Pufferkonzentration. Bei 150 mmol/l Tricin im Aufschlußmedium tritt dagegen der größte Anteil der Lipaseaktivität im Überstand auf, während sich der lipolytische Anteil in der Rohpartikelfraktion wenig ändert. Diese Ergebnisse entsprechen denen, die Rosnitschek (1977) beim Aufschluß von Raps derselben Sorte mit 150 mmol/l Tricin im Extraktionsmedium erhielt.

Anders sind die Verhältnisse offenbar in den Kotyledonen des Rapscultivars "Raporo". Nach differentieller Zentrifugation des Rohhomogenats aus Kotyledonen 4 Tage alter Keimlinge dieses Cultivars, die in saccharosehaltigem, mit 30 mmol/l Tricin gepuffertem Medium aufgeschlossen wurden, enthält die Fettschicht annähernd 30% der Lipaseaktivität, während sich im Überstand der Hauptanteil von 52-57% wiederfindet. Mit 150 mmol/l Tricin im Extraktionsmedium verbleiben nur noch 5% der Lipaseaktivität je nach Testmethode in den Lipidbodies und 70-80% sammeln sich im Überstand an. Die Sedimentierbarkeit der Lipase wird wie bei "Lemkes Diamant" nur wenig von der Pufferkonzentration beeinflusst (Tab. 6a und 6b).

Um zu sehen, ob die Verteilung der lipolytischen Aktivitäten bei der Sorte "Lemkes Diamant" oder "Raporo" der Regelfall ist, wurden die intrazellulären Verteilungen der Enzymaktivitäten bei 4 weiteren Zuchtsorten untersucht. Wie aus Abb. 10 a-b hervorgeht, finden sich bei den zusätzlich untersuchten Sorten die höchsten Lipaseaktivitäten im Überstand und nicht in der Fettfraktion wie bei "Lemkes Diamant". Letztere Sorte scheint eine Ausnahme bezüglich der intrazellulären Verteilung der lipolytischen Aktivitäten zu sein.

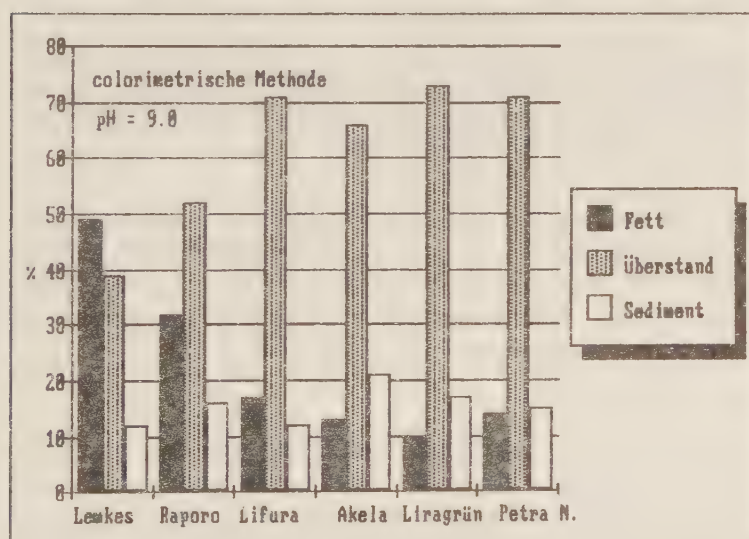
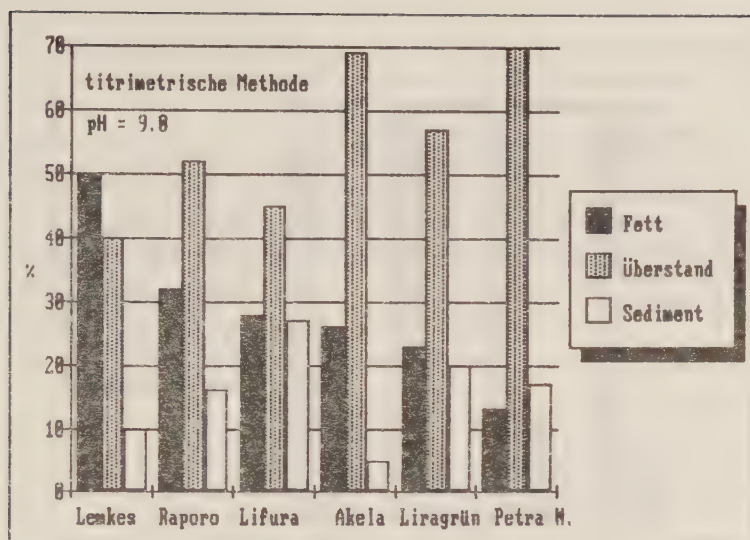


Abb.10a: Relative Verteilung der lipolytischen Enzymaktivitäten von Kotyledonen 4 Tage alter Rapskeimlinge verschiedener Varietäten nach differentieller Zentrifugation. Aufschluß im EM mit 0.03 mol/l Tricin. Substrat: Triolein

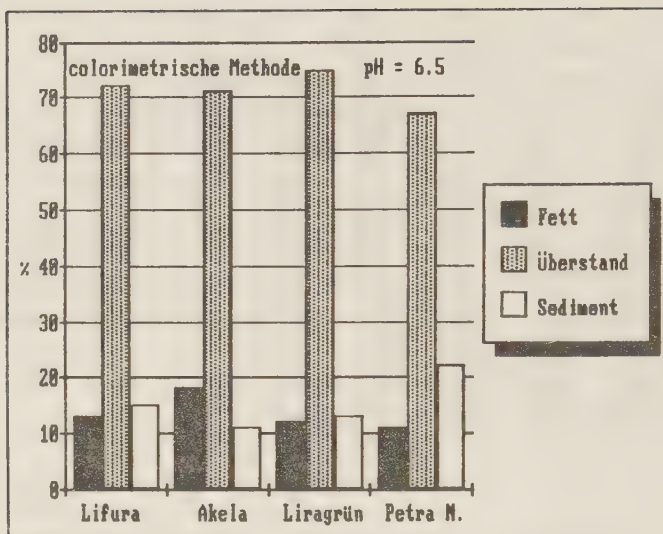


Abb.10b: Relative Verteilung der lipolytischen Enzymaktivitäten von Kotyledonen 4 Tage alter Rapskeimlinge verschiedener Varietäten nach differentieller Zentrifugation. Aufschluß im EM mit 0.03 mol/l Tricin. Substrat: Triolein

Bei Verwendung des colorimetrischen Testverfahren können im Unterschied zur titrimetrischen Methode in allen Fraktionen sowohl im sauren als auch im alkalischen Milieu 57-75% der Lipaseaktivitäten im Überstand und 8-50% in der Fettfraktion gemessen werden.

3.2. Bindung der Lipase an die Lipidbodies

Die in 3.1. dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, daß die Lipase bei den einzelnen Varietäten unterschiedlich fest an die Lipidbodies gebunden ist. Diese Annahme wurde im folgenden Experiment überprüft: Aus Kotyledonen 4 Tage alter Rapskeimlinge der Sorten "Raporo"

und "Lemkes Diamant" wurden im Extraktionsmedium mit 0.03 mol/l Tricinpuffer die Lipidbodyfraktion isoliert. Anschließend wurden sie im EM mit 0.15 mol/l Tricin in der Zentrifuge bei 27 000 x g (30 min) gewaschen oder bei 62 000 x g (120 min) durch 40%ige in 0.03 mol/l Tricin gepufferte Saccharose flotiert.

Tab.7: Waschen der Lipidfraktion mit 150 mmol/l Tricin im Extraktionsmedium nach Zentrifugation, (30 min bei 27 000 x g). Ausgangsfraktion (Lipidbodies) = 100

Sorte	gewaschene Lipidbodies	Überstand	Sediment
relative Aktivität			
"Lemkes D."	39 ± 3	36 ± 12	25 ± 4
"Petra N."	21 ± 1	53 ± 11	26 ± 8

Sowohl beim Waschen der isolierten Lipidbodies mit erhöhter Pufferkonzentration als auch bei der ersten Flotation durch 40%ige Saccharose verbleibt bei der Sorte "Lemkes Diamant" im Vergleich zu "Petra Nova" mehr Lipaseaktivität in der Fettschicht, während nach der zweiten Flotation bei beiden Varietäten sich nur noch 10% der Aktivität in der Lipidschicht befinden. Der sedimentierbare Anteil der lipolytischen Enzymaktivität liegt bei beiden Sorten bei 25%. Dieser Befund

zeigt, daß die Assoziation der Lipaseaktivität an die Lipidbodies nicht allzu stark sein kann, jedoch sortenspezifische Unterschiede bestehen. Die noch in den isolierten Lipidbodies verbliebenen Aktivitäten von Cytochrom-c-Reductase und Malatsynthase werden durch Flotation vollständig ausgewaschen (Tab.8).

Tab.8: Flotation der isolierten Lipidbodies durch 40% Saccharose (2 h, 62 000 x g) gepuffert in 30 mmol/l Tricin (2h, 62 000 x g). Ausgangsfraction (Lipidbodies) = 100

Sorte		Lipidbodies			Überstand		
		LIP	CCR	MS	LIP	CCR	MS
% verbliebener Aktivität							
"Lenkes	1. Flot.	33.7	0	0	66.3	100	100
D."	2. Flot.	10.8			89.2		
"Petra	1. Flot.	28.5	0	0	71.5	100	100
Nova"	2. Flot.	10.0			90.0		

Um den Einfluß der Ionenstärke auf die Assoziation der Lipase an die Lipidbodies genauer zu untersuchen, wurde die isolierte Fettfraktion mit steigenden Mengen

an KCl inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die nachfolgenden Abbildungen verdeutlichen die Auswirkungen auf die Bindung Lipidbodies/Lipase. Aus den Abb. 11 und 12 geht hervor, daß bei beiden Sorten aus der Lipidschicht eine Membranfraktion isoliert werden kann, die 40% der eingesetzten lipolytischen Enzymaktivität trägt. Da Enzyme als membrangebunden gelten, wenn sie nach einer einstündigen Zentrifugation in einem Schwerfeld von $100\ 000 \times g$ sedimentieren, kann angenommen werden, daß die Lipase an Membranstrukturen assoziiert vorliegen muß, die sich von den Lipidbodyhüllen ablösen lassen. In der Lipidbodyschicht der Sorte "Lemkes Diamant" verbleiben dennoch 27%, bei "Petra Nova" 19% der Enzymaktivität. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß die Stärke der Assoziation der Lipase an die Lipidbodies innerhalb der verschiedenen Sorten möglicherweise variiert. Bei der Behandlung des Sediments mit einer KCl-Lösung von 1 mol/l können bei "Lemkes Diamant" weitere 15%, bei "Petra Nova" weitere 20% der lipolytischen Aktivität solubilisiert werden.

Um Störungen durch das Fett auszuschließen, wurden in Parallelversuchen durch Extraktion des Fettes mit Diethylether die Lipidbodyhüllen der beiden vorher benutzten Varietäten gewonnen. Nach einer einstündigen Zentrifugation des Etherrückstandes bei $130\ 000 \times g$ in 30 mmol/l Tricin gepuffertem EM sedimentieren 60-65% der Lipaseaktivität. Auch hier verbleiben trotz Behandlung des Sediments mit einer 1 mol/l KCl bei "Lemkes Diamant" 38%, bei "Petra Nova" 25%, der Aktivität membrangebunden. Dies läßt den Schluß zu, daß neben den polaren noch andere Kräfte an der Bindung der Lipase an die Membranstrukturen und deren Assoziation mit den Lipidbodyhüllen beteiligt sind.

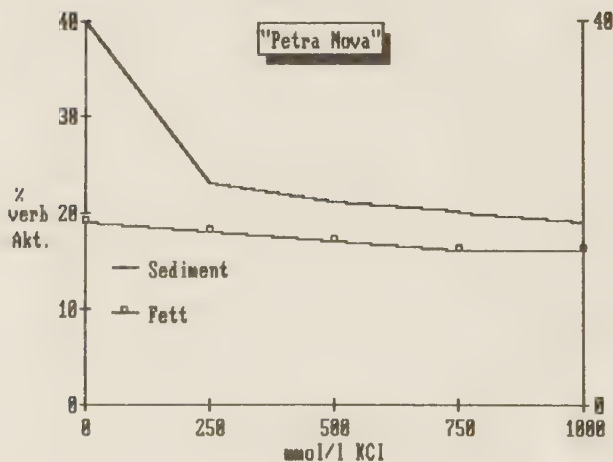
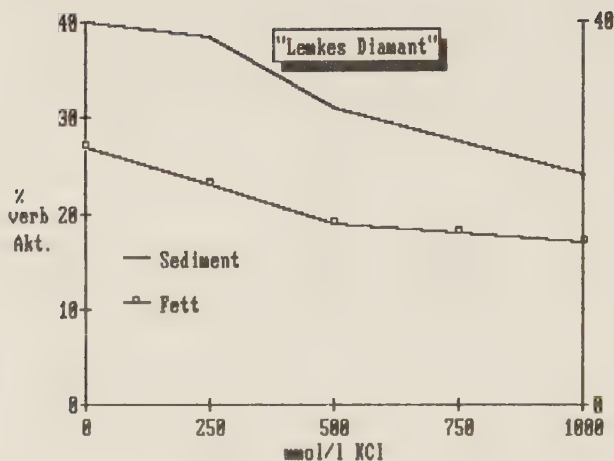


Abb.11: Behandlung der Lipidbodies von "Lemkes Diamant" und "Petra Nova" mit steigender KCl-Konzentration (30 min), Zentrifugationsdauer 2 h, 130 000x g

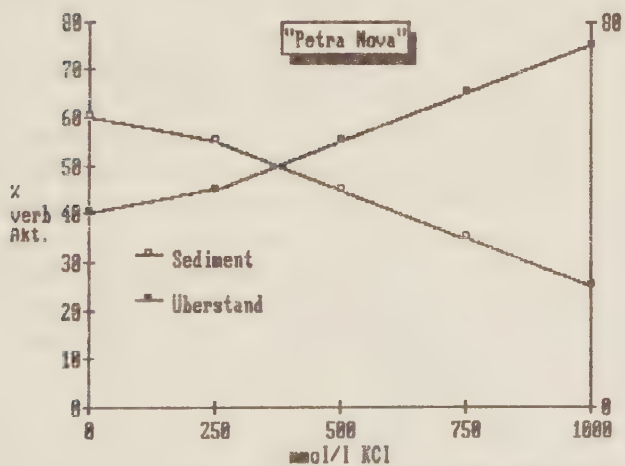
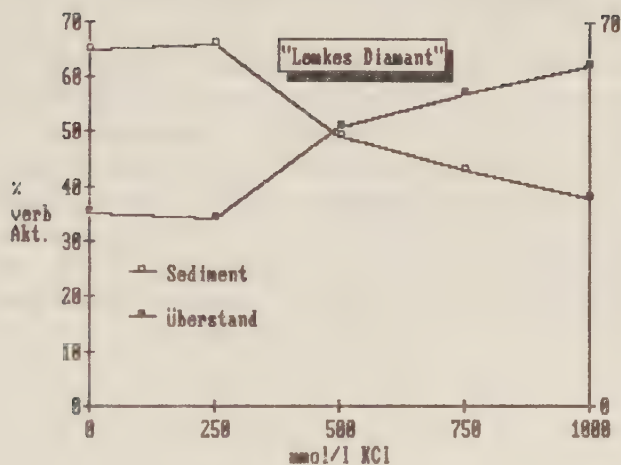


Abb.12: Behandlung der Lipidbodyhüllen von "Lemkes Diamant" und "Petra Nova" mit steigender KCl-Konzentration (30 min), Zentrifugationsdauer 2 h, 130 000 x g

3.3. Fraktionierung der Lipidschicht

Die bisher erhobenen Daten zeigen, daß aus der Lipidbodyfraktion eine lipolytische Struktur abgetrennt werden kann. Nach der Reinigung dieser Struktur durch Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten sollten nun ihre Eigenschaften überprüft werden. Dabei wurde die Varietät "Lemkes Diamant" mit der höchsten Lipaseaktivität in der Fettschicht mit einem Vertreter (Sorte "Akela") verglichen, der den Hauptanteil der lipolytischen Aktivität im Überstand enthielt.

3.3.1. Sorte: "Lemkes Diamant" (Abb.13)

Bei der Auftrennung der durch Flotation in 20%iger Saccharose gereinigten Lipidbodyfraktion aus Kotyledonen vier Tage alter, etiolierter Rapskeimlinge im SDG zeigen sich mehrere ausgeprägte Aktivitätsgipfel der Lipase. Der Hauptgipfel bei einer Dichte von 1.10 kg/l und ein kleiner Gipfel bei 1.21 kg/l sind Triacylglycerol spaltenden Lipasen zuzuordnen, während im fluorometrischen Testverfahren neben den beiden Aktivitätsgipfeln der Lipase noch ein weiteres Maximum bei 1.15 kg/l auftaucht. Dieses Maximum ist wahrscheinlich auf eine unspezifische Acylhydrolase oder vielleicht auf eine Monoacylhydrolase zurückzuführen. Die Verteilung der CCR-Aktivität koinzidiert mit der Lipaseaktivität im Bereich der Schwebedichte von 1.21 kg/l.

Das Auftreten der Aktivitäten von Markerenzymen der Mitochondrien (Fumarase) bzw. Peroxisomen (Katalase) im

Dichtebereich um 1.09 kg/l ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß Organellbruchstücke mit artifiziell anhaftenden Enzymen an oder eingeschlossen zwischen den Lipidbodies vorliegen.

3.3.2. Sorte: "Akela" (Abb.14)

Das gleiche Verteilungsmuster der lipolytischen Enzymaktivität im Saccharosedichtegradienten wie das von "Lemkes Diamant" resultiert bei der Fraktionierung der Fettschicht von "Akela". Auch hier sedimentieren die Lipaseaktivität enthaltenden Strukturen bei einer Dichte von 1.10 kg/l und 1.19 kg/l.

Wie bei "Lemkes Diamant" sind auch die Aktivitäten von CAT und FUM in einer Schwebedichte von 1.09 kg/l meßbar.

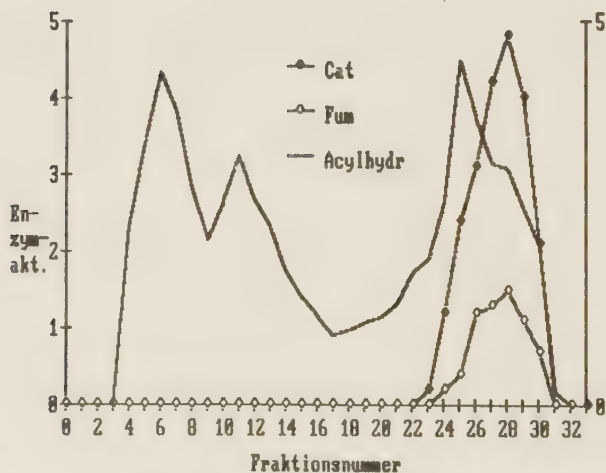
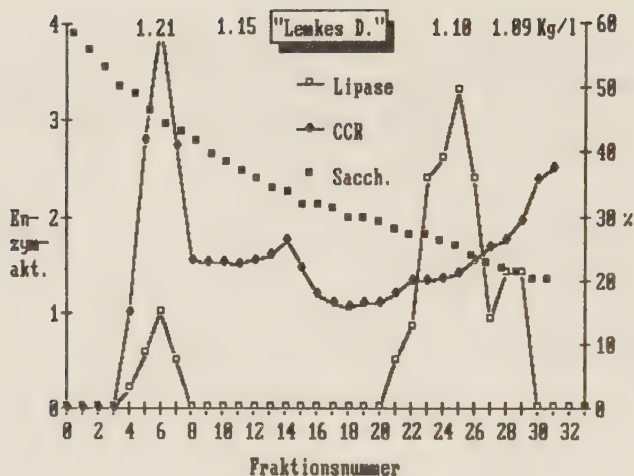


Abb.13: Verteilung der Enzymaktivitäten aus der gereinigten Lipidfraktion von "Lemkes Diamant" im SDG

Eine Einheit entspricht für: LIP (10.0 nkat/ml), Acylhydrolase (10.0 nkat/ml), CAT (1.0 μ kat/ml), CCR (0.5 μ kat/ml), Saccharose (103.8 g/l), FUM (20.0 nkat/ml)

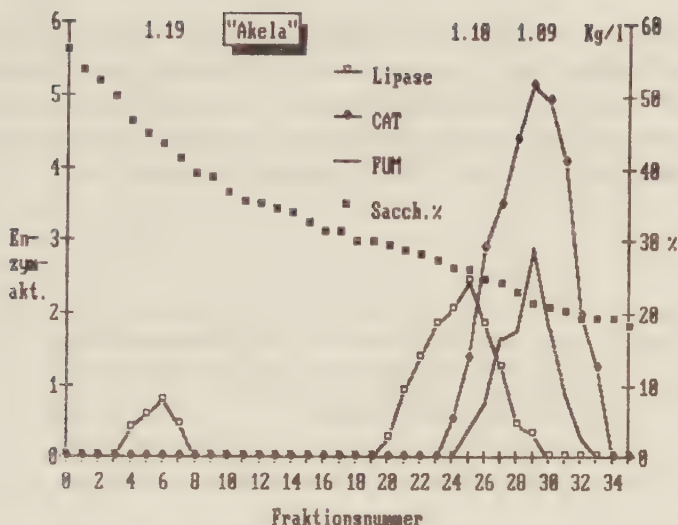


Abb.14: Verteilung der Enzymaktivitäten aus der gereinigten Lipidfraktion von "Akela" im SDG

Eine Einheit entspricht für: LIP (10.0 nkat/ml), CAT (1.0 μ kat/ml), FUM (20.0 nkat/ml), Saccharose (103.8 g/l)

3.4. Fraktionierung der Lipidbodyhüllen

Zur Überprüfung der Annahme, daß die im SDG isolierten, lipolytischen Strukturen Lipase-tragende Membranen sein könnten, die sich aus Lipidbodyhüllen zusammensetzen, wurden solche Hüllen durch Entfetten der Lipidbodies von 4 Rapsvarietäten mit Diethylether isoliert und deren Dichte im SDG bestimmt.

Tabelle 9 gibt Aufschluß über den Einfluß der Extrak-

tion des Fettes mit Diethylether auf die prozentuale Verteilung der lipolytischen Aktivität beim Cultivar "Petra Nova". Mit zunehmender Diethylethereinwirkung wird die Lipase vermehrt solubilisiert, was aber mit einem stärkeren Aktivitätsverlust gekoppelt ist.

Tab.9: Verteilung der Lipaseaktivität nach unterschiedlich langem Entfetten der Lipidbodyfraktion mit Diethylether (Sorte "Petra Nova").
100 = 789.7 nkat/Fraktion

Zeit h	wäßrige Phase	Etherextrakt	Ausbeute %
% Lipaseaktivität			
2.5	4.5	95.5	93
3.5	12.5	87.5	78
4.5	33.4	66.6	52
5.5	54.8	45.2	55

Die Lipidbodyhüllen der im folgenden besprochenen Rapsvarietäten wurden durch eine einstündige Zentrifugation des Etherextrakts bei 130 000 x g isoliert und ihre Dichte im SDG bestimmt.

3.4.1. Sorte: "Lemkes Diamant" (Abb.15)

Die Auftrennung der entfetteten Lipidbodyhüllen im SDG ergab das in Abb. 15 dargestellte Verteilungsmuster. Das einzige Maximum der Lipaseaktivität findet sich bei einer Dichte von 1.19 kg/l und fällt exakt mit dem des Enzyms Cytochrom-c-Reductase und einem Maximum des Phospholipidgehaltes zusammen. Zwei zusätzliche Gipfel des Phospholipidgehaltes decken sich mit den Maxima in der Verteilung der Aktivität von Acylhydrolase in einem für das Endoplasmatische Reticulum typischen Dichtebereich von 1.13 Kg/l und 1.17 kg/l (Lord et al., 1973; Muto und Beevers, 1974; Huang und Moreau, 1978; Theimer und Rosnitschek, 1978).

3.4.2. Sorte: "Raporo" (Abb.16)

Ein ähnliches Verteilungsmuster der Enzymaktivitäten im SDG wie das von "Lemkes Diamant" zeigte sich bei "Raporo" nach Auftrennung der Lipidbodyhüllen. Auch hier überlappen die Aktivitätsgipfel von Lipase und CCR bei einer Dichte von 1.20 kg/l. Das Maximum der Cytochrom-c-Reductase liegt im Unterschied zu "Lemkes Diamant" nicht bei 1.20 kg/l, sondern bei 1.09 kg/l. Ein weiterer Gipfel der Aktivität von Cytochrom-c-Reductase fällt mit der Aktivität einer unspezifischen Acylhydrolase oder Monoacylglycerollipase bei 1.15 kg/l zusammen.

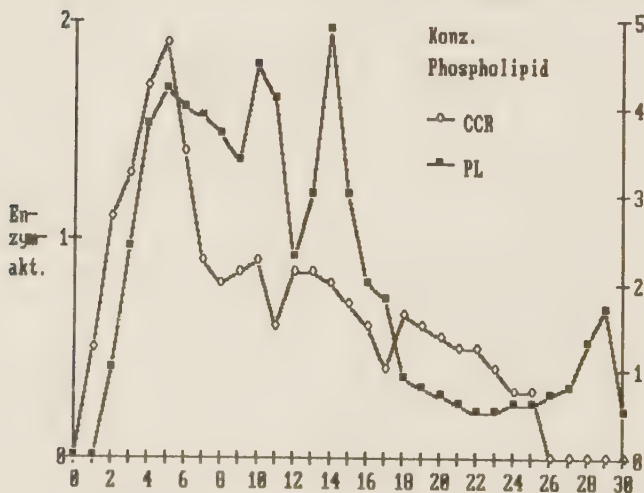
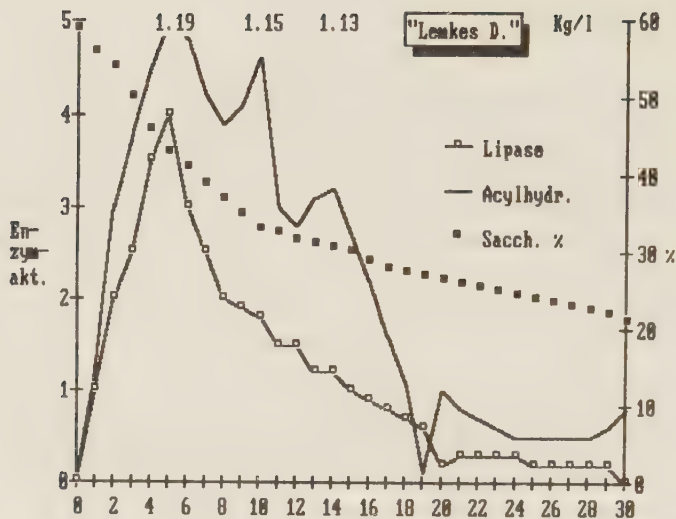


Abb. 15: Verteilung der Enzymaktivitäten aus der Lipidbodyhüllenfraktion von "Lemkes Diamant" im SDG
Eine Einheit entspricht für: LIP (10.0 nkat/ml), Acylhydrolase (10.0 nkat/ml), CCR (0.1 μ kat/ml), Phospholipide (0.33 mmol/ml), Saccharose (103.8 g/l)

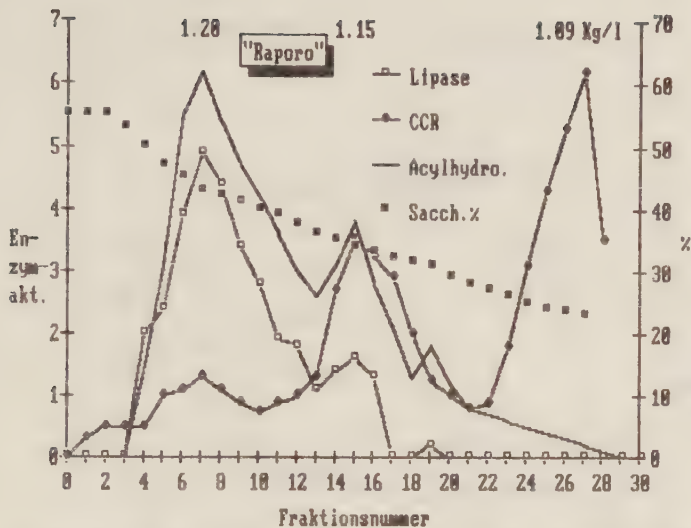


Abb.16: Verteilung der Enzymaktivitäten aus der Lipidbodyhüllenfraktion von "Raporo" im SDG

Eine Einheit entspricht für: LIP (10.0 nkat/ml), Acylhydrolase (10.0 nkat/ml), CCR (0.25 μ kat/ml), Saccharose (103.8 g/l)

3.4.3. Sorten: "Liragrün", "Akela" und "Petra Nova" (Abb. 17, 18, 19)

Nach Auftrennung der Lipidbodyhüllen von "Liragrün" (Abb. 17), "Petra Nova" (Abb. 18) und "Akela" (Abb. 19) im SDG ergaben sich dieselben Schwebedichten für die Maxima der Lipaseaktivitäten. Die meßbare Verteilung der Aktivität von Fumarase, Katalase, Cytochrom-c-Reductase bei 1.09 kg/l, Malatsynthase bei 1.24 kg/l und Cytochrom-c-Oxidase bei 1.17 kg/l im SDG deuten darauf hin, daß sich Membranstrukturen von Mitochondrien und Glyoxysomen aufgrund des engen Kontaktes zu den Lipidbodies an deren Hüllen anheften.

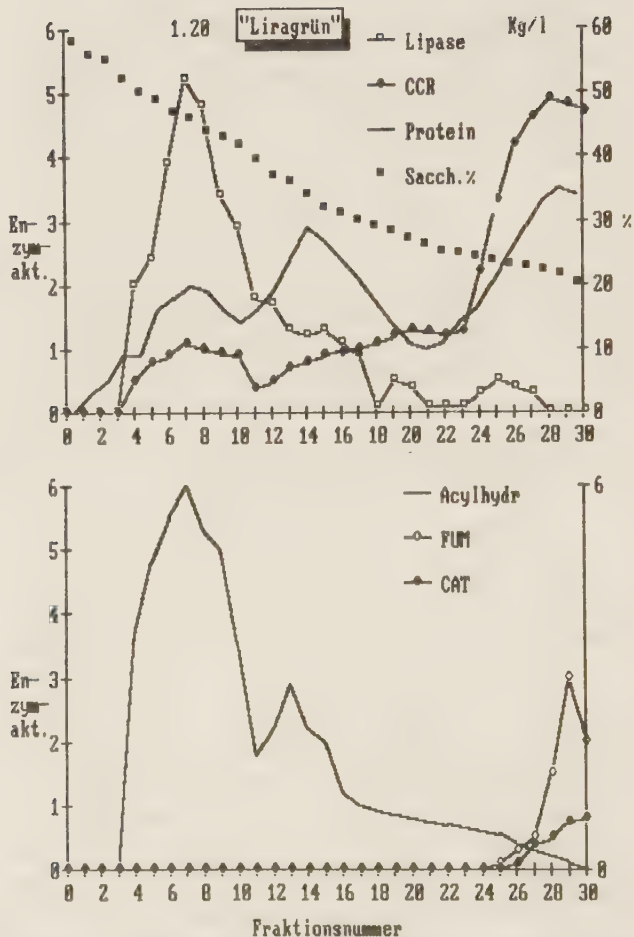


Abb.17: Verteilung der Enzymaktivitäten aus der Lipidbodyhüllenfraktion von "Liragrün" im SDG

Eine Einheit entspricht für: LIP (10.0 nkat/ml), CAT (0.6 nkat/ml), CCR (0.2 μ kat/ml), Protein (0.2 mg/ml), Acylhydrolase (10.0 nkat/ml), Saccharose (103.0 g/ml), FUM (0.2 nkat/ml)

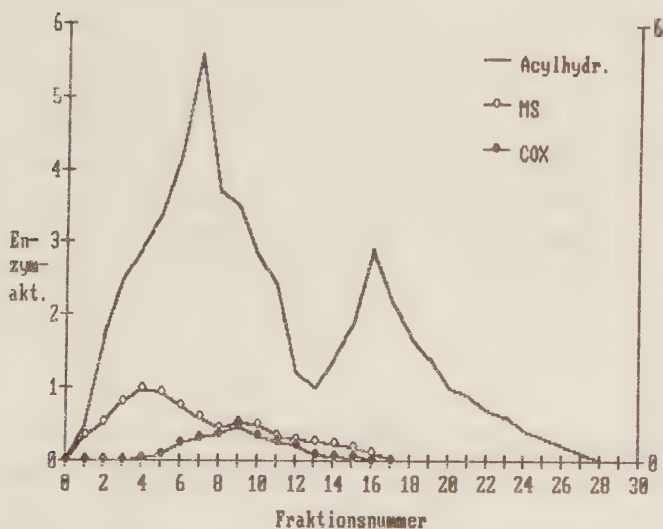
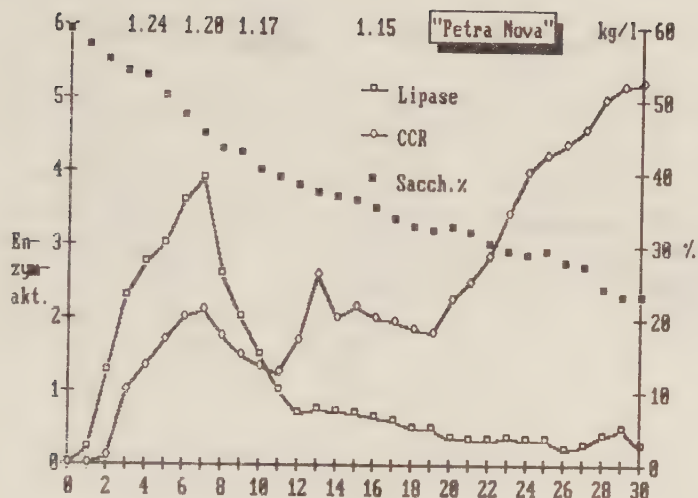


Abb.18: Verteilung der Enzymaktivitäten aus der Lipidbodyhüllenfraktion von "Petra Nova" im SDG
 Eine Einheit entspricht für: LIP (10.0 nkat/ml), MS (3.0 nkat/ml), Acylhydrolase (10.0 nkat/ml), COX (37.5 nkat/ml), CCR (0.2 μ kat/ml), Saccharose (103.0 g/ml)

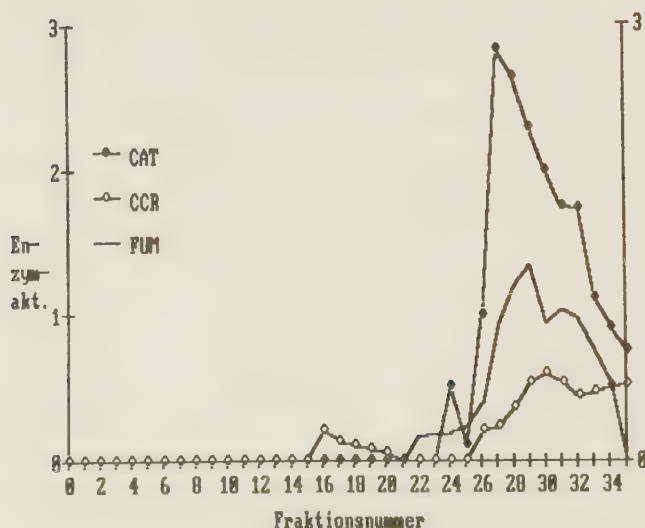
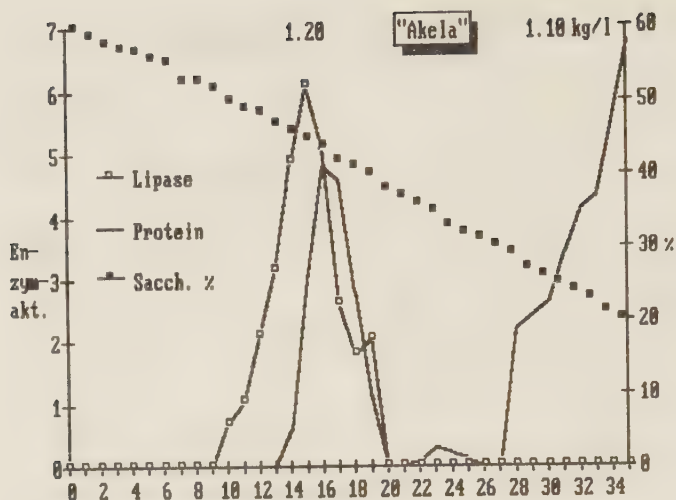


Abb.19: Verteilung der Enzymaktivitäten aus der Lipidbodyhüllenfraktion von "Akela" im SDG
 Eine Einheit entspricht für: LIP (2.0 nkat/ml), FUM (2.0 nkat/ml), CAT (0.66 nkat/ml), Protein (1.5 mg/ml), CCR (1.0 μ kat/ml), Saccharose (103.8 g/ml)

3.5. Phospholipidgehalt

Der Phospholipidgehalt der Fraktion mit maximaler Lipaseaktivität aus dem kontinuierlichen, linearen Saccharosedichtegradienten bei einer Dichte von 1.19 kg/l der Zuchtvarietät "Petra Nova" ist aus nachstehender Tabelle 10 ersichtlich.

Tab.10: Phospholipidgehalt und -zusammensetzung der Fraktion mit maximaler Lipaseaktivität aus dem SDG.

Phospholipid	mol %
Phosphatidsäure	9.7 ± 1
Phosphatidylserin/-inositol	17.2 ± 1
Phosphatidylethanol/-glycerol	25.4 ± 3
Phosphatidylcholin	47.7 ± 1

Die Phospholipidzusammensetzung der Lipase-tragenden Membranstruktur ähnelt der früher beschriebener mikrosomaler Membranen und Lipidbodyhüllen (Donaldson, 1972, 1976), wobei der Anteil an Phosphatidylcholin am höchsten ist, gefolgt von Phosphatidylethanol/-glycerol und Phosphatidylserin/-inositol.

3.6. Fraktionierung des 27 000 x g Überstandes

Da bei den Sorten "Petra Nova", "Raporo", "Akela" und "Liragrün" der Hauptteil der lipolytischen Aktivität nicht wie bei der Varietät "Lemkes Diamant" in der Fettschicht, sondern im 27 000 x g Überstand wiedergefunden wurde, sollte überprüft werden, ob die Lipaseaktivität in dieser Zellfraktion strukturgebunden oder löslich vorliegt. Dazu wurde der jeweilige Überstand aller fünf Cultivare einer dreistündigen Zentrifugation bei 130 000 x g unterworfen. Stellvertretend für die 5 untersuchten Varietäten gibt Abb. 20 die Verteilung der Enzyme Cytochrom-c-Reductase und Lipase sowie des Lipid- und Proteingehalts zweier Sorten im resultierenden Überstand und im Sediment wieder.

Diese Ergebnisse zeigen, daß bei den getesteten Sorten 60-80% der lipolytischen Enzymaktivitäten nach einer 3-stündigen Zentrifugation bei 130 000 x g sedimentiert werden können. Die Dichte des Mediums (ca. 18% Saccharose) und die Zentrifugationsdauer machen es unwahrscheinlich, daß bei diesem Verfahren gelöstes Enzymprotein sedimentieren würde. Vielmehr zeigen die Resultate, daß die Lipaseaktivität bei den untersuchten Varietäten im Überstand an eine Membranfraktion gebunden vorliegt oder das Enzym aufgrund seiner vermuteten lipophilen Eigenschaften riesige Polymere bildet. Auch 40-60% der Gesamtaktivität des Leitenzyms des Endoplasmatischen Reticulums, die Cytochrom-c-Reductase, treten im Niederschlag auf. Der Hauptanteil der Lipide jedoch findet sich selbstverständlich im Überstand wieder.

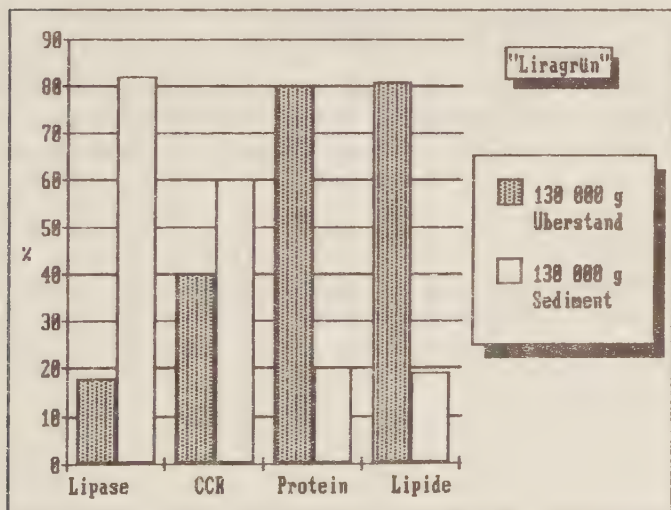
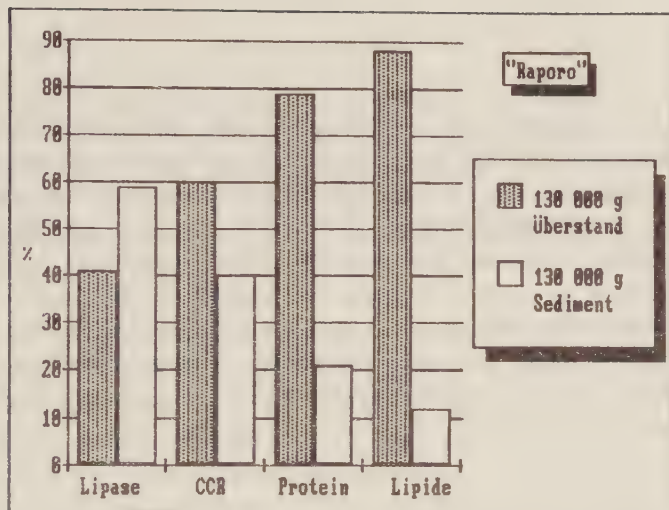


Abb.20: Verteilung der Enzyme Cytochrom-c-Reductase und Lipase, Lipid und Proteingehalt bei "Raporo" und "Liragrün" nach Zentrifugation des 27 000 x g Überstandes bei 130 000 x g

Da aufgrund der Aufschlußmethode die lipolytischen Membranen aus der Fettschicht in den Überstand abgelöst werden könnten, sollte bei einer Zentrifugation in einem mittleren Schwerfeld von 130 000 x g im Sediment eine Anreicherung der Enzymaktivität erfolgen. In der Tabelle 11 sind die Anreicherungen der möglicherweise membrangebundenen lipolytischen Enzymaktivitäten in Präparationen aus drei Rapssorten zusammengestellt. Sie zeigen eine 1.5-2.5fache Erhöhung der spezifischen Lipaseaktivität.

Tab.11: Zunahme der spezifischen Aktivität der Lipase durch Zellfraktionierung

Sorte	U ₁	U ₂	U ₃	S ₃	Anreicherung
nkat/mg Protein					
"Lemkes D."	55.4	20.5	10.8	113.2	2.0
"Petra N."	75.4	19.7	11.2	109.4	1.5
"Akela"	48.2	18.1	17.9	116.4	2.4

3.7. Auftrennung der mikrosomalen Fraktion

Die Mikrosomalfraktion kann bekanntlich aus verschiedenen Membranfraktionen der Zellen zusammengesetzt sein

(Morre und Mollenhauer, 1974), die auch einen unterschiedlichen Gehalt an Proteinen und Lipiden besitzen. Daher wurde eine weitere Fraktionierung im SDG durchgeführt. Bei den untersuchten Varietäten liegt das Maximum der Lipaseaktivität bei einer Dichte von 1.08-1.09 kg/l (Abb. 21a-b).

Von der auf den Gradienten aufgetragenen Lipaseaktivität wurde nach der Zentrifugation entsprechend der jeweiligen Sorte ca. 65-75% der lipolytischen Aktivität in dieser Schwebbedichte wiedergefunden. Auch der Lipase-tragende Nebengipfel bei 1.19-1.20 kg/l konnte bei allen untersuchten Cultivaren beobachtet werden.

In Tabelle 12 ist die Zunahme der spezifischen Aktivität der Lipase in den Zellfraktionen dargestellt, die durch fraktionierte Zentrifugation des Rohextraktes und durch Dichtegradientenzentrifugation der Mikrosomalfraktion erreicht wurde.

Tab.12: Anreicherung der Lipase aus der mikrosomalen Fraktion (Sorte "Liragrün") im SDG

Fraktion	nkat	mgP	nkat/ mgP	Anrei- cherung
Rohextrakt	1305.3	110.1	11.9	1.0
Überstand	796.7	54.9	14.5	1.2
130 000 x g Sediment	614.5	14.4	42.6	3.6
Gradientenfraktion mit maximaler Aktivität	110.7	0.7	158.1	13.3

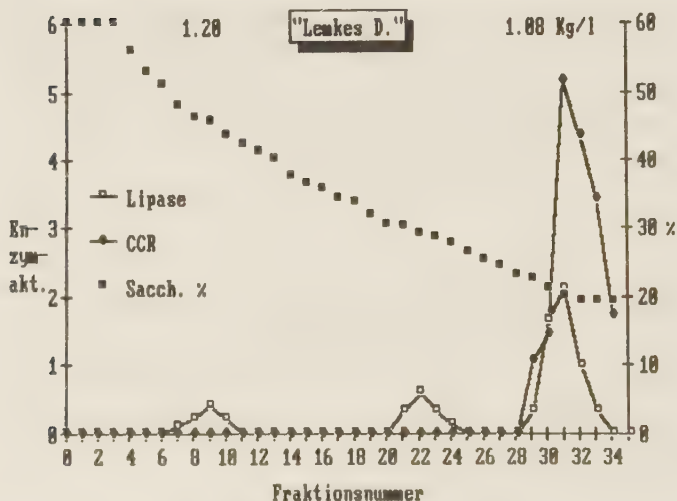
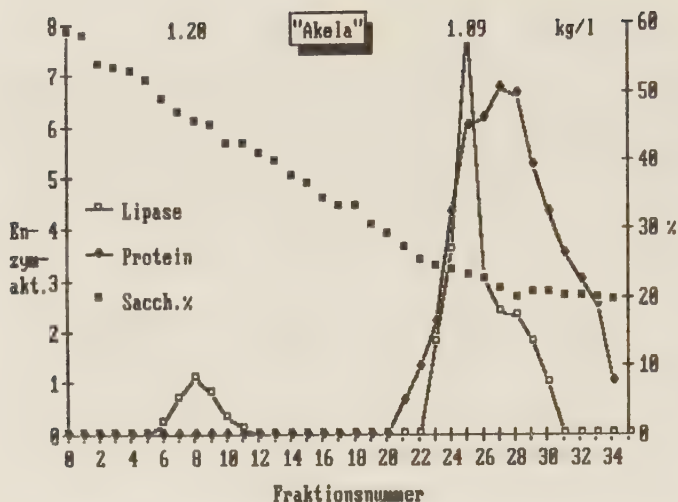


Abb.21a: Verteilung der Enzymaktivitäten aus der mikrosomalen Fraktion von "Akela" und "Lemkes Diamant" im SDG
 Eine Einheit entspricht für "Akela": LIP (12.0 nkat/ml), Protein (0.15 mg/ml), Saccharose (103.8 g/l)
 Eine Einheit entspricht für "Lemkes Diamant": LIP (10.0 nkat/ml), CCR (1.0 μ kat/ml), Saccharose (103.8 g/l)

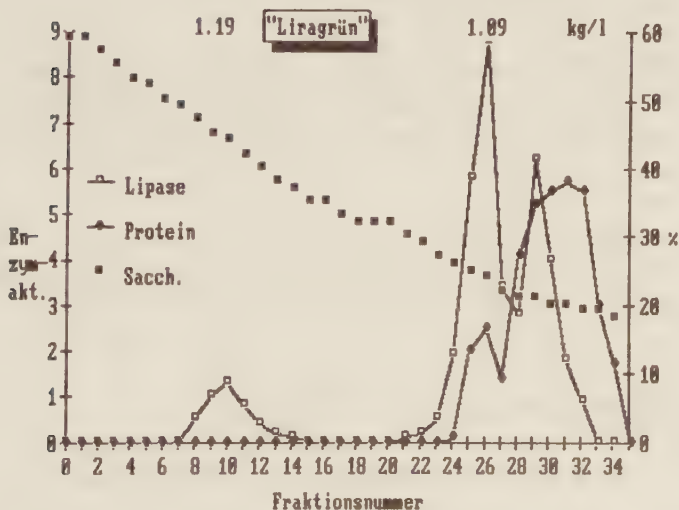
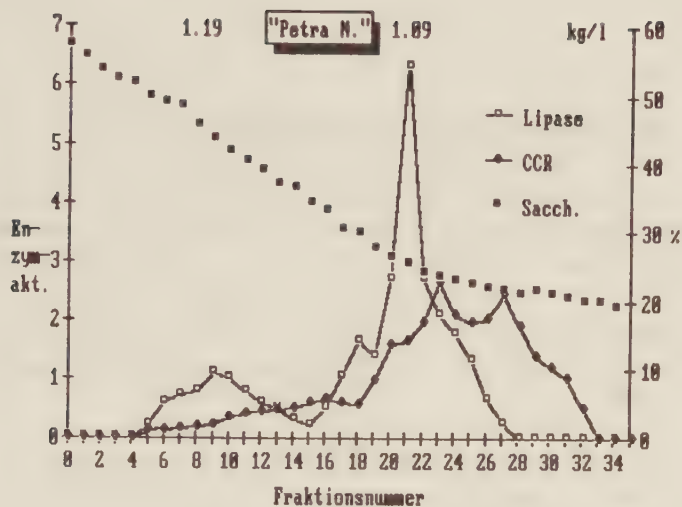


Abb.21b: Verteilung der Enzymaktivitäten aus der mikrosomalen Fraktion von "Petra Nova" und "Liragrün" im SDG
 Eine Einheit entspricht für "Petra Nova": LIP (5.0 nkat/ml), CCR (0.5 μ kat/ml), Saccharose (103.8 g/l)
 Eine Einheit entspricht für "Liragrün": LIP (10.0 nkat/ml), Protein (0.25 mg/ml), Saccharose (103.8 g/l)

4. Eigenschaften der Lipasen

Mit Ausnahme des Cultivars "Lemkes Diamant" ist bei den untersuchten Varietäten der Hauptteil der Lipaseaktivität nach der Präparation nicht in den Lipidbodies lokalisiert. Dennoch wurde die jeweils gereinigte Lipidbodyfraktion der verschiedene Sorten aus zwei Gründen für nachfolgende Untersuchungen ihrer Eigenschaften verwendet:

- (1) Der Wirkungsort der Lipase ist die Grenzfläche zwischen Lipid- und Wasserphase, also die Oberfläche der Lipidbodies.
- (2) Neben der Verwendung von definierten Lipasesubstraten kann durch Einsatz der natürlichen Reservefette die spezifische Substrat- und pH-Abhängigkeit überprüft werden.

Da die Lipasen nicht in reiner Form vorliegen, können lediglich ihre relativen Aktivitäten miteinander verglichen werden.

4.1. Substratspezifität

4.1.1. Hydrolyse verschiedener Triacylglycerole

Das Speicherfett von Raps liegt als gemischtes Triacylglycerol mit 20-40% Eruca-, 14-20% Öl-, 15% Linol- und 4% Palmitinsäure vor (Appelquist, 1971). Somit wäre zu erwarten, daß die Triacylglycerolester der Erucasäure

Tab.13: Hydrolyse verschiedener Triacylglycerole durch die Lipasen der Lipidbodyfraktion verschiedener Rapssorten. Titrimetrische Methode, pH=9.0

Substrat		Sorten				
		erucasäurehaltig			erucasäurefrei	
		"Lemkes Diamant"	"Petra Nova"	"Raporo"	"Lira- grün"	"Akela"
		relative Aktivität				
Triolein	100	100	100	100	100	100
Trierucin	62	42	46	64	71	67
Sonnenbl.öl	83	58	30	94	62	78
Rapsöl	71	45	61	52	78	62
Trilinolein	42	--	--	--	--	--

-- nicht bestimmt

Relative Aktivität von 100 entspricht:

nkat/gFg	Sorte	nkat/gFg	Sorte
128	("Lemkes Diamant")	98	("Raporo")
75	("Petra Nova")	68	("Lifura")
33	("Liragrün")	61	("Akela")

Titrimetrischer Test; pH 9.0

re bevorzugt hydrolysiert werden müßten. Statt dessen wird jedoch das Triolein von den Lipasen der getesteten Varietäten mit höchster Umsatzrate abgebaut, unabhängig davon, ob diese erucasäurehaltig sind oder nicht. Mit Ausnahme von "Petra Nova" zeigen die Lipasen der Lipid-

bodies der Cultivare "Lemkes Diamant", "Raporo" und "Lifura" sogar gegenüber dem natürlichen Substrat Sonnenblumenöl eine höhere Spezifität als gegenüber dem definierten Substrat Trierucin. Aus Rapsöl setzen die Lipasen von "Lemkes Diamant" und "Raporo" ähnliche Mengen Fettsäure frei wie aus Trierucin.

4.1.2. Hydrolyse von Tri-, Di- und Monopalmitat durch Lipidbodylipasen

Die Lipase der Varietät "Petra Nova" zeigt eine leicht höhere Spezifität gegenüber dem Monopalmitat als die Varietät "Akela". Beide Lipasen jedoch hydrolysieren Monopalmitat mit einer höheren Rate als Dipalmitat, was möglicherweise in der besseren Löslichkeit des Monoesters in Wasser begründet sein könnte.

Tab.14: Hydrolyse verschiedener Substrate

Substrat	Sorten	
	"Petra Nova"	"Akela"
	relative Aktivität	
Tripalmitat	100	100
1.3 Dipalmitat	76	72
Monopalmitat	164	149

Relative Aktivität von 100 entspricht:

nkat/gFg	Sorte	Titrimetr. Test
31.1	("Petra Nova")	pH=9
25.7	("Akela")	

4.2. pH-Abhängigkeit der Lipidbodylipasen

Bei Verwendung der titrimetrischen Testmethode (Hokkeborn und Rick, 1982) zeigen alle untersuchten Varietäten ihre maximale lipolytische Aktivität in einem Bereich von pH 8.5-9.0, unabhängig davon, welches Substrat verwendet wurde. Unterhalb eines pH-Wertes von 7 bzw. über einen pH-Wert von 11 hinaus ergibt der Test keine Enzymaktivität mehr (Abb. 22a-c). Auch bei Anwendung des fluorometrischen Testverfahrens (Guibault und Hiesermann, 1969) werden keinerlei lipolytische Aktivitäten unter pH 6 und über pH 10 beobachtet. Mit dem künstlichen Substrat N-Methylindoxylmyristat liegt das Maximum der Lipaseaktivität einmal bei pH 8.5 ("Akela" und "Lifura") und zum anderen bei pH 9 ("Liragrün" und "Petra Nova") (Abb. 22d). Die Resultate stimmen mit denen von Theimer und Rosnitschek (1978) überein.

Da die Empfindlichkeit der titrimetrischen Methode im sauren Bereich auf Grund der geringen Dissoziation der freigesetzten Fettsäuren nicht ausreichen könnte, um lipolytische Aktivitäten zu bestimmen, wurde darüberhinaus der colorimetrische Test (Nixon und Chan, 1979) angewandt.

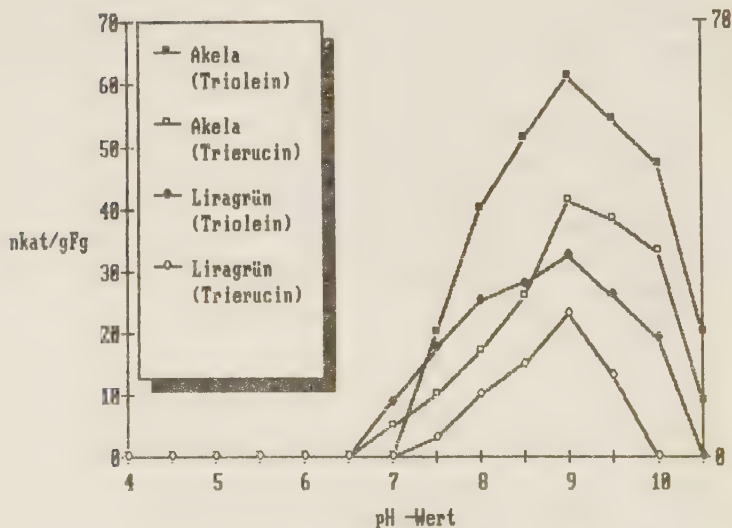
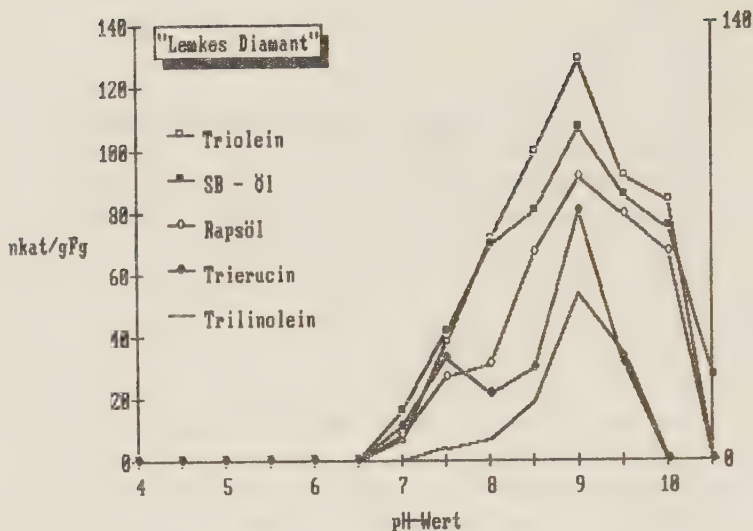


Abb.22a: Abhängigkeit der Lipaseaktivität verschiedener Rapssorten vom pH-Wert. Titrimetrische Testmethode, Substrate: Triolein, Trierucin, Trilinolein, Raps- und Sonnenblumenöl

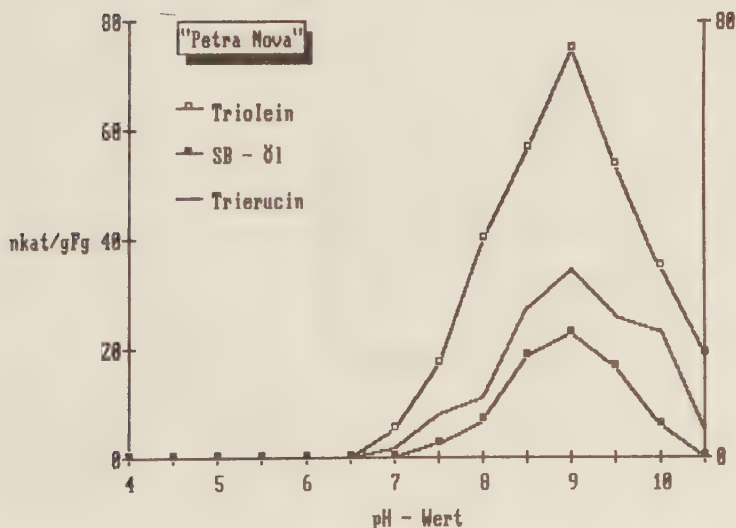
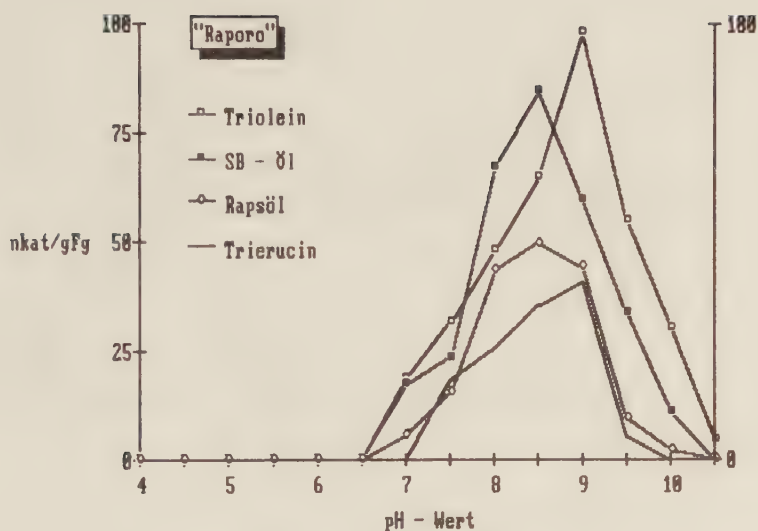


Abb.22b: Abhängigkeit der Lipaseaktivität der Rapssorten "Raporo" und "Petra Nova" vom pH-Wert. Titrimetrische Testmethode, Substrate: Triolein, Trierucin, Raps- und Sonnenblumenöl

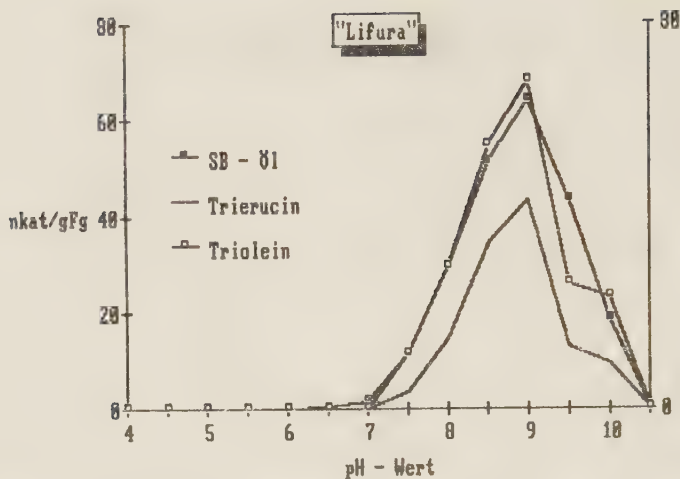


Abb.22c: Abhängigkeit der Lipaseaktivität der Sorte "Lifura" vom pH-Wert. Titrimetrische Methode. Substrate: Trierucin, Triolein und Sonnenblumenöl

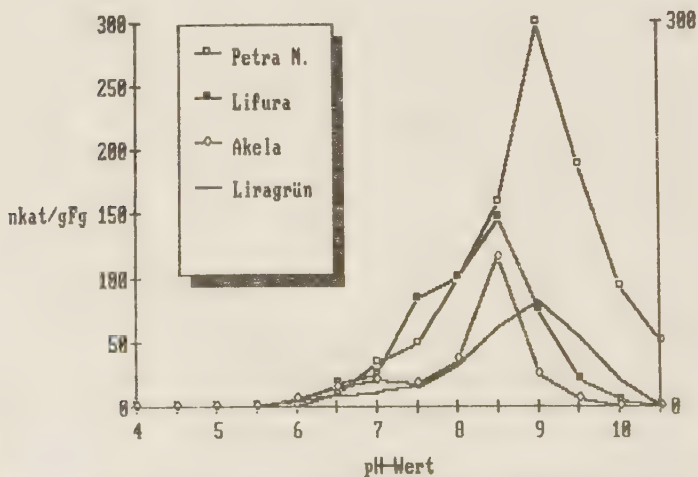


Abb.22d: pH-Abhängigkeit der Acylhydrolaseaktivität verschiedener Raps cultivare mit N-Methylindoxylmyristat als Substrat

Tab.15: Hydrolyse von Trierucin und Trilinolein im sauren und alkalischen Milieu durch die mit den Lipidbodies assoziierte Lipase verschiedener Sorten (colorimetrischer Test)

Sorte	Substrat	pH 6.5	pH 9.0
nkat/gFg			
"Akela"	Trierucin	24	21
	Trilinolein	20	52
"Raporo"	Trierucin	9	27
	Trilinolein	4	17
"Liragrün"	Trierucin	5	9
	Trilinolein	15	8
"Lifura"	Trierucin	14	4
	Trilinolein	69	51

Wie sich aus Tabelle 15 entnehmen läßt, sind alle Lipasen der untersuchten Cultivare bei pH 6.5 und 9.0 aktiv.

Es besteht eine Sortenabhängigkeit dahingehend, daß die Lipasen der untersuchten Cultivare vornehmlich bei pH 6.5 oder pH 9.0 oder bei beiden pH-Werten Trierucin abbauen, z.B. bei "Akela" im Verhältnis 1:1, bei "Lifura" 3.5:1, bei "Raporo" 1:3. Trilinolein wird von einem Teil der Lipasen im Vergleich zu Trierucin bei pH 6.5 um den Faktor 3 ("Liragrün"), bei "Lifura" um den Faktor 5, bei der Sorte "Raporo" um den Faktor 2 schlechter abgebaut. Lediglich die Lipaseaktivität der Varietät "Akela" bevorzugt keines der beiden Substrate. Im Alkalischen jedoch zeigen die Lipasen aller vier untersuchten Varietäten eine Substratabhängigkeit gegenüber Trierucin und Trilinolein. Keine der in dieser Arbeit getesteten lipolytischen Fraktion hydrolysiert Trierucin oder Trilinolein ausschließlich im Säuren wie Lin und Huang (1983) bei zwei Rapssorten ("Tower" und "Dwarf Essex") feststellten.

Im Unterschied zu den bei den Varietäten "Raporo" und "Liragrün" im colorimetrischen Test gemessenen Hydrolysewerten von Trierucin bei pH 6.5 (Tab. 15) konnte mit dem titrimetrischen Test im Säuren keine Hydrolyse von Trierucin erfaßt werden (Abb. 22 b, c). Der Grund dafür dürfte im sauren Milieu und der damit verbundenen Abten Erucasäuremolekülen liegen.

4.2.2. Autolipolyse der isolierten Lipidbodies

Aus 4 Tage alten Rapskeimlingen wurden Lipidbodies isoliert. Diese Lipidbodies führen unter geeigneten Bedingungen Autolipolyse durch, d.h. eine Inkubation der Lipidbodies bei 37°C bis zu 90 min lang setzt Fettsäuren aus den Speicherlipiden frei. Diese Fettsäuren sind ein Maß für den endogenen Abbau der natürlichen Triacylglycerole durch die noch mit der Fettschicht assoziierten Lipase. In einem Teil der getesteten Varietäten weist die Aktivität ein pH-Optimum bei pH 6.5 und pH 9.0 auf (z.B. "Raporo", "Akela", "Petra Nova" und "Liragrün"), bei anderen läuft die Autolipolyse im alkalischen mit einem Maximum bei pH 9.0 ("Lemkes Diamant") oder nur im sauren Bereich ab (z.B. "Lifura").

Tab.16: Autolipolyse gereinigter Lipidbodies verschiedener Rapsvarietäten (colorimetrische Testmethode)

Sorte	pH 6.5	pH 9.0
	pkat/gFg	
"Raporo"	161.8	77.0
"Akela"	214.0	84.0
"Liragrün"	31.0	14.0
"Petra Nova"	33.0	75.0
"Lemkes Diamant"	0.0	152.9
"Lifura"	62.0	0.0

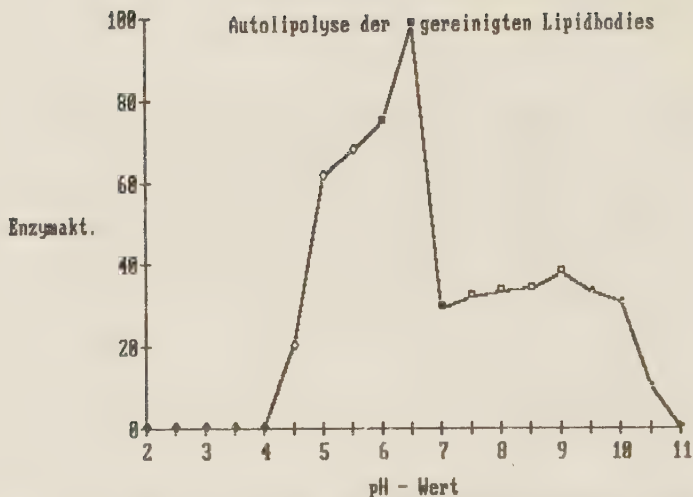


Abb.23a: Autolipolyse der gereinigten Lipidbodies in Abhängigkeit vom pH-Wert. 100 = 214 pkat/gFg (Sorte: "Akela").
Colorimetrischer Test

In Abb. 23a und 23b wurden folgende Puffer verwendet:

Citrat/HCl (pH 2-4), Succinat/HCl (pH 4-6), Imidazol/HCl (pH 6-7),
Tris/HCl (pH 7-9) und Glycin/NaOH (pH 9-11)

Nicht nur die gereinigten Lipidbodies der Sorte "Akela" zeigen im sauren Milieu maximale endogene Freisetzung von Fettsäuren, sondern auch im Rohhomogenat ist die Autolipolyse bei pH-Werten zwischen 5-6 am größten. Dagegen liegt die Hydrolyserate von Triolein im Rohhomogenat bei pH=6.5 um 60% unter der, die bei einem pH-Wert von 9.0 zu beobachten ist (Abb. 23a, 23b).

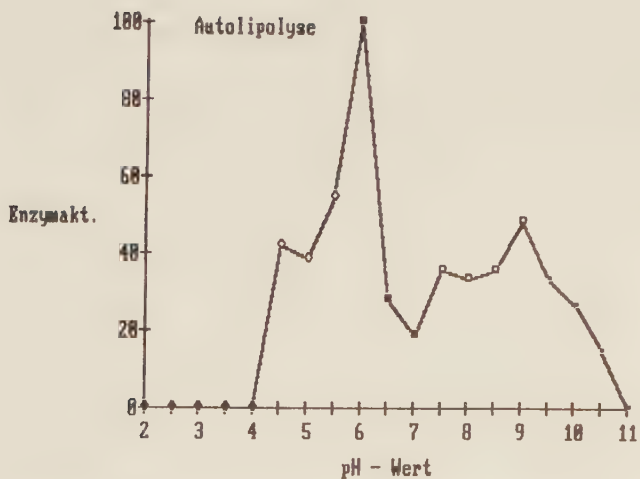
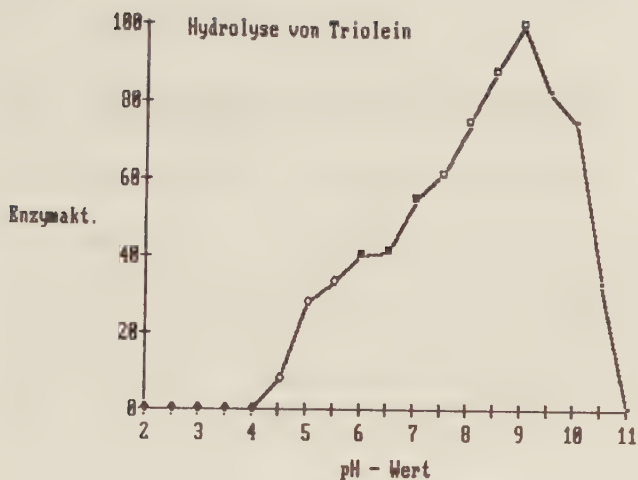


Abb.23b: Effekt des pH-Wertes auf die Lipaseaktivität in verschiedenen Fraktionen der Varietät "Akela". Hydrolyse von Triolein
 100 = 75 nkat/gFg; Autolipolyse des Rohhomogenats.
 100 = 112 pkat/gFg

4.3. Effektoren der Lipaseaktivität

4.3.1. Einfluß von Sulfurhydryl-Giften

Lipasen besitzen für die Katalyse bedeutsame SH-Gruppen (Muto und Beevers, 1974; Sanders und Pattee, 1975; Dundas et al., 1978). Daher sollte der Einfluß von p-Hydroxymercuribenzoat (p-HMB) und p-Chloromercuriphenylsulfonsäure (p-CMPS) auf die Aktivität der Lipasen von vier Rapssorten untersucht werden, die aus der Lipidbody- bzw. aus der Mikrosomalfraktion isoliert wurden.

Weder p-HMB (1 mmol/l) noch p-CMPS (bis 4 mmol/l) beeinflussen die Aktivität der aus der Lipidbody- und mikrosomalen Fraktion angereicherten Lipase von "Petra Nova" und "Akela", während bei "Lemkes Diamant" und "Raporo" in Übereinstimmung mit Befunden von Rosnitschek (1978) und Fußeder (1981) p-HMB und p-CMPS Lipaseinhibitoren sind. Durch Zugabe von 0.1 mmol/l p-CMPS zum Testgemisch werden die Aktivitäten zu etwa 60% bei einer Konzentration von 0.2 mol/l vollständig gehemmt (Tab. 17 und 18).

Tab.17: Effekt von p-CMPS und p-HMB auf die partiell gereinigten Lipasen

		"Petra Nova"		"Akela"	
		Lipase isoliert aus der			
zugegeb.	Endkonz.	mikro-	Lipid-	mikro-	Lipid-
Substanz	im Test	somalen	body-	somalen	body-
	mmol/l	Fraktion		Fraktion	
relative Aktivität					
keine	--	100	100	100	100
p-HMB	1	80	95	90	99
p-CMPS	1	85	95	82	99
	2	82	95	80	98
	3	78	92	85	99
	4	70	88	71	89

Relative Aktivität von 100 entspricht:

nkat/ml	Sorte	Lipaseaktivität der
48.5	("Petra Nova")	Lipidbody-Fraktion
11.0	(")	mikrosomalen "
31.6	("Akela")	Lipidbody- "
9.8	(")	mikrosomalen "

Tab.18: Einfluß von p-HMB und p-CMPS auf die Aktivität
partiell gereinigter Lipasen

"Lemkes Diamant" "Raporo"					
Lipase isoliert aus der					
zugegeb.	Endkonz.	mikro-	Lipid-	mikro-	Lipid-
Substanz	im Test	somalen	body	somalen	body
	mmol/l	Fraktion		Fraktion	
relative Aktivität					
keine	--	100	100	100	100
p-HMB	0.2	0	0	0	0
p-CMPS	0.1	42	37	48	45
	0.2	0	0	0	0

Relative Aktivität von 100 entspricht:

nkat/ml	Sorte	Lipaseaktivität der
70.5	("Lemkes Diamant")	Lipidbody-Fraktion
15.0	(")	mikrosomalen "
56.8	("Raporo")	Lipidbody- "
8.2	(")	mikrosomalen "

4.3.2. Einfluß von Salzen und Detergentien

In den Tabellen 19 und 20 ist die Wirkung verschiedener Salze und Detergentien auf die Lipasen von vier Rapsvarietäten dargestellt.

Tab.19: Einfluß verschiedener Salze auf die Lipaseaktivität

"Petra Nova"			"Akela"		
Lipase isoliert aus der					
Ionen	Endkonz. im Test mmol/l	mikro- somalen Fraktion	Lipid- body- Fraktion	mikro- somalen Fraktion	Lipid- body- Fraktion
relative Aktivität					
keine	--	100	100	100	100
KCL	10	89	91	95	98
EDTA	1	87	84	82	79
	2	75	70	71	75
	5	70	70	61	75
	10	35	47	38	42
	20	28	42	31	40
	50	11	7	4	5

Relative Aktivität von 100 entspricht:

nkcat/ml	Sorte	Lipaseaktivität der
48.5	("Petra Nova")	Lipidbody-Fraktion
11.0	(")	mikrosomen "
31.6	("Akela")	Lipidbody- "
9.8	(")	mikrosomen "

Tab.20: Einfluß verschiedener Salze auf die Lipaseaktivität

"Lemkes Diamant" "Raporo"					
Lipase isoliert aus der					
Ionen	Endkonz. im Test mmol/l	mikro- somalen Fraktion	Lipid- body- Fraktion	mikro- somalen Fraktion	Lipid- body
relative Aktivität					
Keine	--	100	100	100	100
KCl	10	95	90	89	92
EDTA	1	18	20	25	16
	2	0	0	0	0

Relative Aktivität von 100 entspricht:

nkat/ml	Sorte	Lipaseaktivität der
70.5	("Lemkes Diamant")	Lipidbody-Fraktion
15.0	(")	mikrosomalen "
56.8	("Raporo")	Lipidbody- "
8.2	(")	mikrosomalen "

Die Lipaseaktivität aus der mikrosomalen Fraktion und aus der Lipidbodyfraktion der Sorten "Akela" und "Petra Nova" zeigt bei einer EDTA-Konzentration von 1 mmol/l nur eine 10-20% Hemmung. Im Gegensatz dazu vermindert dieselbe EDTA-Konzentration die Aktivität der Rapslipasen von "Lemkes Diamant" und "Raporo" um 75-80%. Ähnliche Ergebnisse mit der Sorte "Lemkes Diamant" erhielten auch Rosnitschek und Theimer (1980) und Fußeder (1981).

Tab.21: Einfluß von Detergentien auf die Lipaseaktivität

		"Petra Nova"		"Akela"	
		Lipase isoliert aus der			
Detergenz	Endkonz. im Test mmol/l	mikro- somalen Fraktion	Lipid- body- Fraktion	mikro- somalen Fraktion	Lipid- body- Fraktion
relative Aktivität					
keines	--	100	100	100	100
Digitonin	0.01 %	0	0	0	0
Triton	0.1 %	20	14	18	12
X-100	1.0 %	0	0	0	0
n-Octyl-	25 mmol/l	99	98	92	91
Glucosid	40 mmol/l	66	77	48	51
	100 mmol/l	60	75	55	52
CHAPS	5 mmol/l	97	96	91	93
	10 mmol/l	55	50	39	32
	20 mmol/l	20	16	31	25
	30 mmol/l	18	11	21	15

Relative Aktivität von 100 entspricht:

nkat/ml	Sorte	Lipaseaktivität der
48.5	("Petra Nova")	Lipidbody-Fraktion
11.0	(")	mikrosomalen "
31.6	("Akela")	Lipidbody-
9.8	(")	mikrosomalen "

Tab.22: Einfluß von Detergentien auf die Lipaseaktivität

		"Lemkes Diamant"	"Raporo"			
		Lipase isoliert aus der				
Deter-	Endkonz.	mikro-	Lipid-	mikro-	Lipid-	
gentien	im Test	somalen	body-	somalen	body-	
		Fraktion		Fraktion		
relative Aktivität						
Keine	--	100	100	100	100	
Digitonin	0.01 %	0	0	0	0	
Triton-	0.1 %	8	5	10	12	
X-100	1.0 %	0	0	0	0	
n-Octyl-	25 mmol/l	87	89	70	75	
Glucosid	40 mmol/l	44	51	35	40	
	100 mmol/l	39	45	30	25	
CHAPS	5 mmol/l	90	85	80	76	
	10 mmol/l	20	30	15	12	
	20 mmol/l	0	0	0	0	

Relative Aktivität von 100 entspricht:

nkat/ml	Sorte	Lipaseaktivität der
70.5	("Lemkes Diamant")	Lipidbody-Fraktion
15.0	(")	mikrosomalen "
56.8	("Raporo")	Lipidbody-
8.2	(")	mikrosomalen "

Ein für die bisher untersuchten Lipasen gemeinsames Charakteristikum ist die starke Hemmwirkung von Triton X-100 bei sehr geringen Konzentrationen im Testgemisch (Muto und Beevers, 1974; Lin und Huang, 1983; Maeshima und Beevers, 1985). Demzufolge wurde der Einfluß von weiteren Detergentien auf die Lipaseaktivitäten untersucht. Wie aus den Tabellen 21 und 22 ersichtlich, hemmt 0.1% Triton X-100 die Lipasen der getesteten Sorten zu 80-95%, während Digitonin bei 0.01% schon eine vollständige Inaktivierung bewirkt. Ein weiteres nicht-ionisches Detergenz, das n-Octyl-Glucosid, beeinflußt bis zu seiner kritischen Micellkonzentration (CMC-Wert) von 25 mmol/l die lipolytischen Aktivitäten von "Akela" und "Petra Nova" kaum, während die Lipaseaktivitäten von "Lemkes Diamant" und "Raporo" um 13-30% gehemmt werden. Dagegen verringert das zwitterionische CHAPS bei einer Konzentration von 10 mmol/l die Lipaseaktivitäten der untersuchten Varietäten schon um 60-85%.

Offensichtlich unterscheiden sich die Lipasen der unterschiedlichen Rapssorten auch in ihrem Verhalten gegenüber Detergentien. Im Gegensatz dazu wurden keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der untersuchten Lipasen aus den einzelnen Zellfraktionen einer Varietät gegenüber SH-Giften, Salzen und Detergentien beobachtet; es handelt sich also möglicherweise bei der aus der Lipidbody- und der Mikrosomalfraktion isolierten Lipase der jeweiligen Sorte um ein und dasselbe Enzym.

4.4. Hitzestabilität der Lipasen (Abb.24)

Die Hitzestabilität der Lipasen wurde überprüft, indem die lipolytischen Zellfraktionen der verschiedenen Rapssorten 10 min lang bei steigender Temperatur inkubiert und anschließend auf 0-4°C abgekühlt wurden, bevor die lipolytische Aktivität bestimmt wurde. Bis 40°C behalten alle vier Sorten 80-95% ihrer Aktivität bei. Bei 50°C jedoch zeigt sich schon die unterschiedliche Thermostabilität der einzelnen Lipasen. Die Sorte "Akela" besitzt die hitzestabilste, die Sorte "Rapor" dagegen die hitzelabilste Form. Bei 60°C ist keine der Lipasen mehr aktiv.

4.5. Temperaturabhängigkeit der Lipaseaktivität

Die Lipaseaktivität in der Lipidbodyfraktion der verschiedenen Varietäten wurde bei einer Temperatur zwischen 20°C und 45°C im titrimetrischen Test bei einem pH von 9.0 gemessen. Die Abbildung 25 illustriert, daß die optimale Temperatur für die Aktivität der verschiedenen Lipasepräparationen zwischen 30°C und 40°C schwankt.

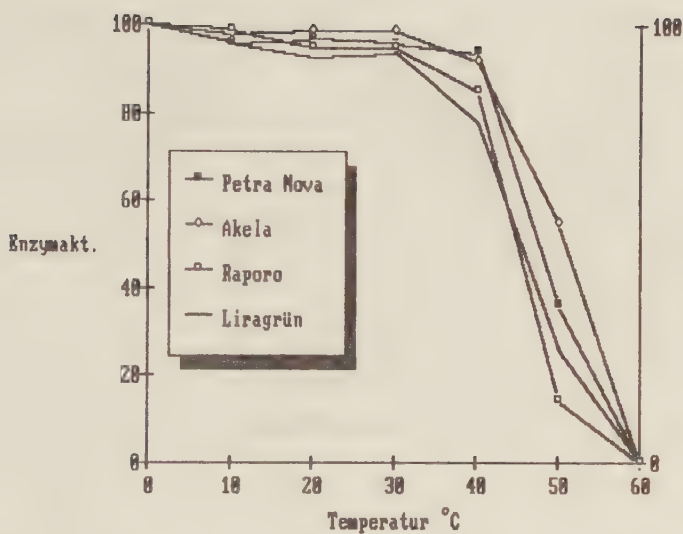


Abb.24: Effekt der Temperatur auf die Stabilität der Rapslipasen

Relative Aktivität von 100 entspricht:

108.2 nkat ("Petra Nova"),
 27.6 nkat ("Akela"),
 70.5 nkat ("Raporo"),
 16.9 nkat ("Liragrün").

Temperatur im Test: 37°C, pH = 9.0

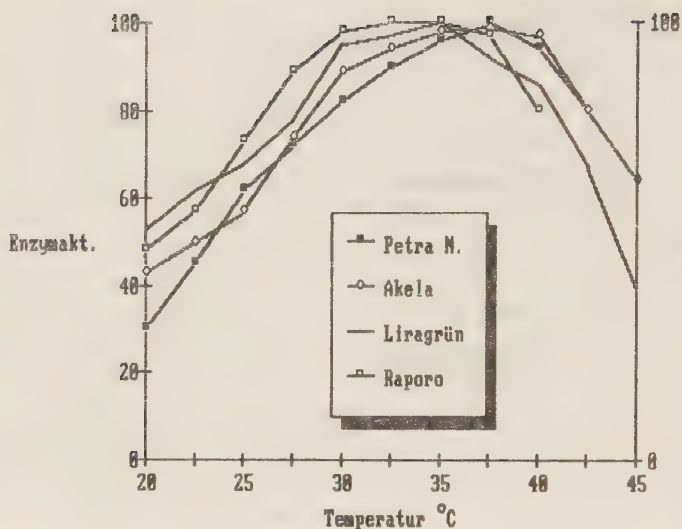


Abb. 25: Optimale Temperatur der Lipaseaktivität im titrimetrischen Enzymtest. Substrat: Triolein; Relative Aktivität von 100 entspricht: 27 nkat ("Petra Nova."), 35 nkat ("Akela"), 16 nkat ("Liragrün"), 20 nkat ("Raporo")

5. Reinigung der Lipase

Die Charakterisierung der Lipase und ihre Entwicklung in den Kotyledonen der verschiedenen Rapskultivare setzt die Reinigung des Enzyms bis zur Homogenität voraus. Bei höheren Pflanzen ist dies aus fettspeichernden Kotyledonen bis dato noch nicht gelungen. Da die zur Solubilisierung der Lipase aus dem acetongefällten Rohextrakt und den Lipidbodyhüllen notwendige Detergenzkonzentration bei der Sorte "Petra Nova" die geringste Hemmung der Lipaseaktivität verursachte, wurde diese Varietät ausgewählt, um die Reindarstellung der Lipase zu versuchen.

Die Isolierung des Enzyms aus dem Acetonpulverextrakt und den Lipidbodyhüllen gelang jedoch nur teilweise. Erst die Reinigung aus dem Rohhomogenat von Kottyledonen drei Tage alter Rapskeimlinge der Sorte "Petra Nova" hatte Erfolg.

Die Lipaseaktivität wurde durch die 40%ige Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vom Hauptanteil des Fremdproteins abgetrennt. Eine 6-fache Anreicherung war die Folge. Der aufgenommene Niederschlag wurde durch eine Sephadex G-25 Säule entsalzt, um die lipolytische Aktivität im titrimetrischen Test bestimmen zu können. Anschließend erfolgte die weitere Auftrennung durch Säulenchromatographie. Abbildung 26 zeigt die Gelfiltration der Lipase über das FPLC-Gel Superose 6. Neben dem Lipasegipfel sind noch zwei weitere Acylhydrolasegipfel zu sehen. Das Esterasemaximum, das mit dem Lipasegipfel zusammenfällt, ist wahrscheinlich auf die Hydrolyse des p-Nitrophenylacetats durch die Lipase zurückzuführen, während für den zweiten Gipfel eine unspezifische Acylhydrolase verantwortlich zeichnet, da dort mit dem titrimetrischen Test keine Aktivität gemessen werden konnte. Die frühe Elution der Lipase von der Säule deutet auf eine Selbstaggregation der Enzymmoleküle hin.

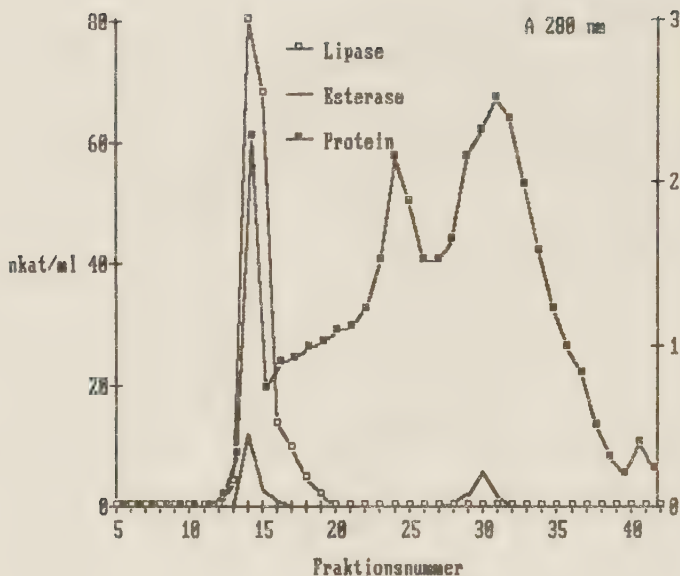


Abb.26: Chromatographie der Lipase nach Ammoniumsulfatfällung (40%) auf dem FPLC-Gel Superose 6

Die lipasereichen Fraktionen der Gelfiltration wurden anschließend einer hydrophoben Affinitätschromatographie unterworfen. Obwohl die Ionenstärke nicht allzu hoch war, adsorbierte die Lipase und konnte erst mit 25 mmol/l n-Octyl-Glucosid im Elutionspuffer von der Säule mit einer 55-fachen Anreicherung heruntergewaschen werden. Die Ausbeute betrug allerdings nur 4.2% (Abb.27).

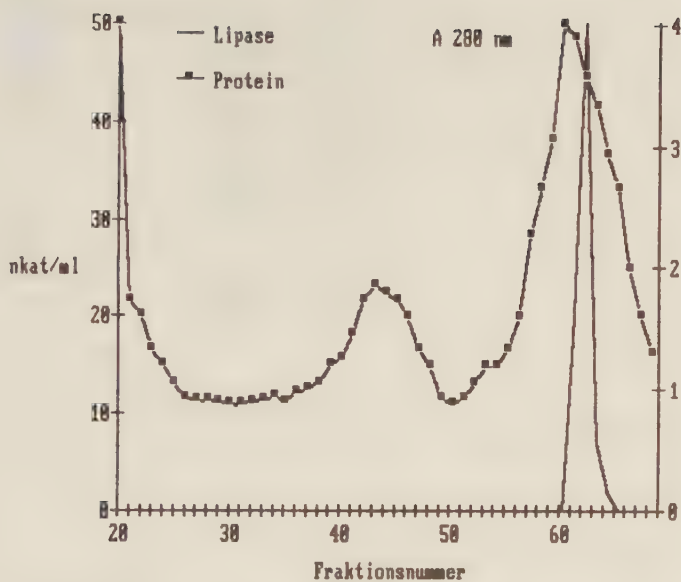


Abb.27: Hydrophobe Chromatographie von Lipase über Octyl-Sepharose CL 4B der nach Gelfiltration über FPLC-Superose 6 gewonnenen Enzymfraktion

Die Tabelle 23 faßt den Ablauf und Erfolg der einzelnen Reinigungsschritte zusammen.

Tab.23: Reinigung von Lipase aus Kotyledonen drei Tage alter Rapskeimlinge der Sorte "Petra Nova"

Reinig. schritt	Gesamt- aktiv. (nkat)	Gesamt- protein (mg)	spez. Aktiv. (nkat/mgP)	Anrei- cherung	Aus- beute %
Rohhomogenat	7263.3	2557.5	2.8	1.0	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ fällung	3399.0	206.4	16.5	5.9	46.8
Chromatogra- phie über FPLC-Sup. 6	537.0	6.3	89.5	31.9	7.4
Chromatogra- phie Octyl- Sepharose CL 4B	307.0	2.0	153.5	54.8	4.2

5.1. Homogenität der gereinigten Lipase

In der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese konnte die Reinheit des isolierten Enzyms bestätigt werden. Nach der Chromatographie über das FPLC-Gel Superose 6 und daran anschließend über n-Octyl-Sepharose CL 4B zeigt die Fraktion mit der höchsten lipolytischen Aktivität nur noch eine einzige Proteinbande. Die Abbildung 28 gibt das Proteinmuster der verschiedenen Fraktionen im Verlauf der Enzymreinigung wieder.

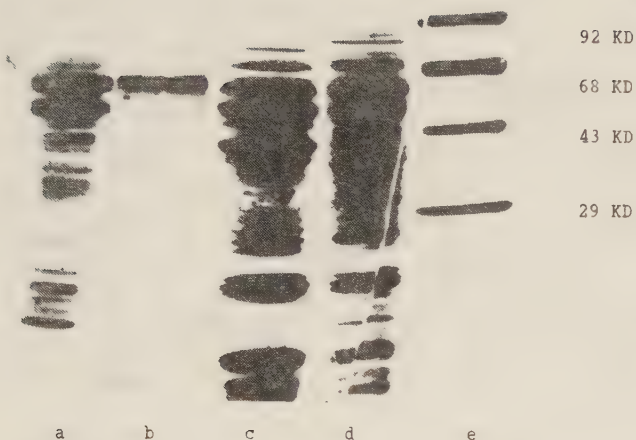


Abb.28: SDS-PAGE verschiedener Enzymfraktionen während der Reinigung der Lipase aus dem Rohhomogenat von Rapskotyledonen der Sorte "Petra Nova"

- a = lipasehaltiger Pool von FPLC-Superose 6
- b = Lipase aus n-Octyl-Sepharose Cl 4B-Peak-Fraktion
- c = Ammoniumsulfatfällung
- d = Rohhomogenat
- e = Eichproteine

5.2. Molekularmassenbestimmung

Über eine mit Standardproteinen geeichte FPLC-Gel Superose 6 Säule wurde die Molekularmasse der Lipase bestimmt (Abb. 29). Für die Lipase ergibt sich aufgrund eines Mittelwertes von 6 Bestimmungen eine apparente Molekülmasse von 2.7×10^6 D, wenn sie in wässrigem Milieu vorliegt.

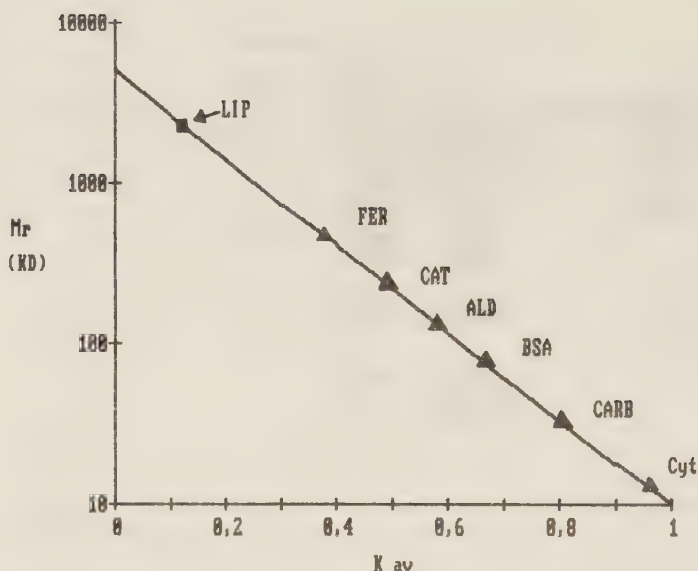


Abb.29: Molekularmassenbestimmung von Lipase durch Gelfiltration über Superose 6. Molekularmasse der Referenzproteine: CYT c., 12 500; Carboanhydrase, 29 000; BSA, 68 000; Aldolase, 160 000; CAT, 220 000; Ferritin, 440 000

Um etwaige Untereinheiten der Lipase bestimmen zu können, wurden Proben des gereinigten Enzyms über SDS-PAGE aufgetrennt (Mirault und Scherrer, 1971). Ein "Calibration-Protein-Kit" diente als Referenz.

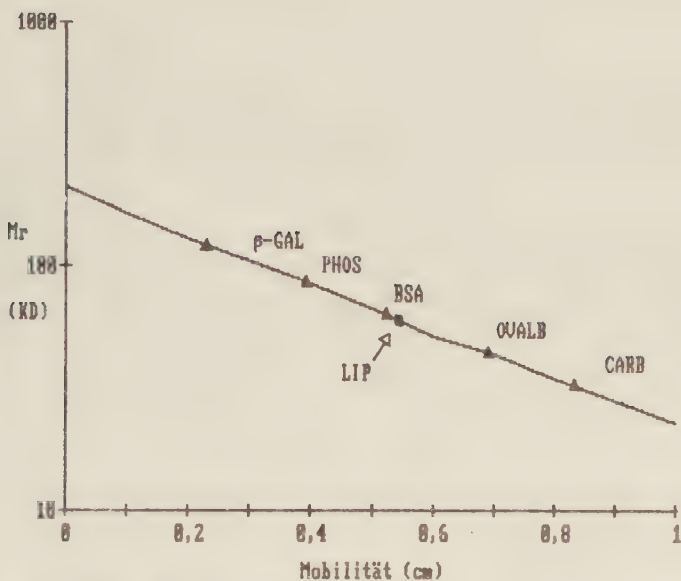


Abb. 30: Bestimmung der Molekularmasse der Lipase über SDS-PAGE
Molekularmassen der Referenzproteine: Carboanhydrase, 29 000;
Ovalbumin, 43 000; BSA, 68 000; Phosphorylase, 92 000; β -Galactosidase, 116 000

Wie aus Abb. 30 zu ersehen ist, beträgt die Molekularmasse eines Monomers 67 KD.

6. Solubilisierung der Lipase aus den Lipidbodyhüllen mit n-Octyl-Glucosid

Da der Wirkungsort der Lipase möglicherweise die Hülle der Lipidbodies ist, wurde die lipolytische Membranfraktion durch Entfetten der Lipidbodies mit anschließender Sedimentation in einem Schwerefeld (130 000 x g) gewonnen. Durch Solubilisierung der Lipase mit n-Octyl-

Glucosid (25 mmol/l) konnte nur eine Ausbeute von 4% und eine vierfache Anreicherung gegenüber der Fettfraktion erzielt werden (Tab. 24).

Das Sedimentationsverhalten der Lipase und ihre Solubilisierung mit Detergenz sind weitere Hinweise darauf, daß sie membrangebunden vorliegen muß.

6.1. SDS-PAGE verschiedener Lipidbodyfraktionen

Aus Abb. 31 ist das Proteinmuster der einzelnen Fraktionen ersichtlich. Die mit Detergenz solubilisierete Fraktion (c) zeigt eine Hauptproteinbande, die der Lipase mit einer Molekülmasse von 67 KD entspricht, sowie mehrere Nebenbanden.

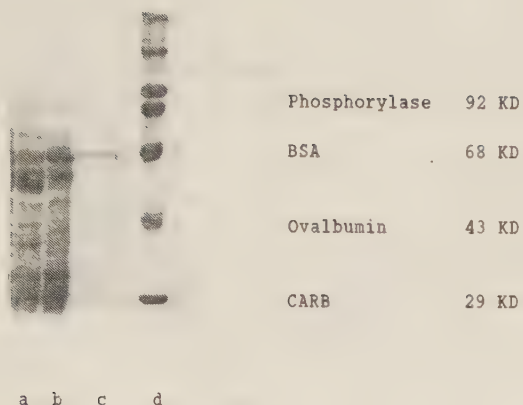


Abb.31: Gel-Elektropherogramm verschiedener Lipidbodyfraktionen aus der Sorte "Petra Nova"

- a = Etherextrakt
- b = Lipidbodyhüllen
- c = durch n-Octyl-Glucosid solubilisierte Lipase
- d = Eichproteine

Tab.24: Partielle Reinigung der Lipase aus der Fettschicht drei Tage alter Rapskeimlinge ("Petra Nova")

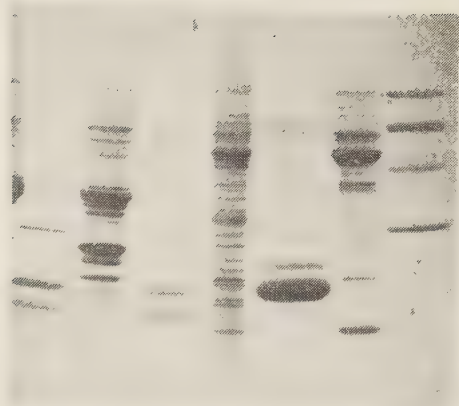
Reinig. schritt	Vol. ml	Gesamt- aktiv. nkat	Gesamt protein mg	spez. Aktiv. nkat/mg	Anrei- cherung	Aus- beute %
Fett	13.5	1435.0	195.7	7.3		100.0
Lipidbody- hüllen	5.0	1275.0	88.1	14.5	2	88.9
Lipolyt. Membran- fraktion	8.3	294.8	16.0	18.4	2.5	20.5
Solubili- sierte Lipase	5.3	63.6	2.3	27.7	3.8	4.4

6.2. Isolierung der Lipidbodyhüllen mit Chloroform/Methanol

Ein völlig unterschiedliches Proteinmuster offenbaren Lipidbodyhüllen drei Tage alter Keimlinge der Varietäten "Petra Nova", bzw fünf Tage alter Keimlinge von "Akela" und "Lifura", wenn sie anstatt mit Diethylether durch Extraktion mit Chloroform/Methanol gewonnen werden. Im Vergleich dazu ist auch die SDS-PAGE des über den Saccharosedichtegradienten gereinigten Endoplasmatischen Reticulums der jeweiligen Sorte zu sehen (Abb. 32).

6.2.1. SDS-PAGE

Eine Bande mit ungefähr 12 KD stellt neben einigen schwächeren Banden nahezu die gesamte Proteinmenge in der Lipidbodyhülle bei "Petra Nova", während bei "Liragrün" und "Akela" das 12 KD Protein neben 2-3 weiteren Proteinbanden nicht den Hauptanteil umfaßt. In den mit Chloroform/Methanol extrahierten Fraktionen war keine lipolytische Aktivität mehr nachweisbar. Eindeutig ist auch erkennbar, daß sich die Polypeptidmuster des Endoplasmatischen Reticulums der verschiedenen Varietäten von denen der Lipidbodyhüllen unterscheiden.



Phosphorylase	92 KD
BSA	68 KD
Ovalbumin	43 KD
CARB	29 KD

a b c d e f g

Abb.32: SDS-PAGE des ER und der Lipidbodyhüllen von "Petra Nova", "Akela" und "Liragrün"

a = Lipidbodyhüllen ("Liragrün") b = ER ("Liragrün")
 c = Lipidbodyhüllen ("Akela") d = ER ("Akela")
 e = Lipidbodyhüllen ("Petra Nova") f = ER ("Petra Nova")
 g = Eichproteine

7. Partielle Reinigung der Lipase aus dem Acetonpulverextrakt

7.1. Solubilisierung der Lipase aus dem Acetonpulverextrakt

Eine Solubilisierung der Lipase aus Acetonpulverextrakt war ohne Einsatz von Detergentien nicht möglich. Die gesamte apparente lipolytische Aktivität sedimen-

tierte nach 30-minütiger Zentrifugationsdauer schon in einem Schwerfeld von 20 000 x g. Da durch die Acetonbehandlung alle Membranstrukturen zerstört sein sollten, liegt die Lipase entsprechend der Hydrophilie des Mediums wahrscheinlich als großes Selbstaggregat vor. Das Acetonpulver-Rohhomogenat wurde deshalb mit CHAPS bzw. mit n-Octyl-Glucosid eine Stunde inkubiert und anschließend eine Stunde bei 130 000 x g abzentrifugiert. Nachstehende Tabellen 25 und 26 sowie die Abbildung 34 illustrieren die Solubilisierung.

Tab.25: Solubilisierung mit 5 mmol/l CHAPS

	spez. Aktiv. (nkat/mgP)	Ausbeute %
Acetonpulverextrakt	4.9	
Überstand	3.8	56.7
Sediment	5.9	26.7

Tab.26: Solubilisierung mit 40 mmol/l n-Octyl-Glucosid

	spez. Aktiv. (nkat/mgP)	Ausbeute %
Acetonpulverextrakt	19.1	
Überstand	5.9	19.4
Sediment	28.1	35.0

Erst bei einer Konzentration von 40 mmol/l n-Octyl-Glucosid wird Lipaseaktivität auf Kosten einer geringeren Ausbeute, die von 54% auf 19% absinkt, solubili- siert. Mit 5 mmol/l CHAPS können jedoch 57% der lipoly- tischen Aktivität, bei einer Ausbeute von 83%, in Lö- sung gebracht werden. Wird das Sediment über einen SDG aufgetrennt, so erreichen die vermuteten Lipasepolymere eine Schwebedichte von 1.11 kg/l und 1.19 kg/l, was an- nähernd den Dichten entspricht, die bei der Isolierung der Lipase aus den Lipidbodies und der mikrosomalen Fraktion bestimmt wurden.

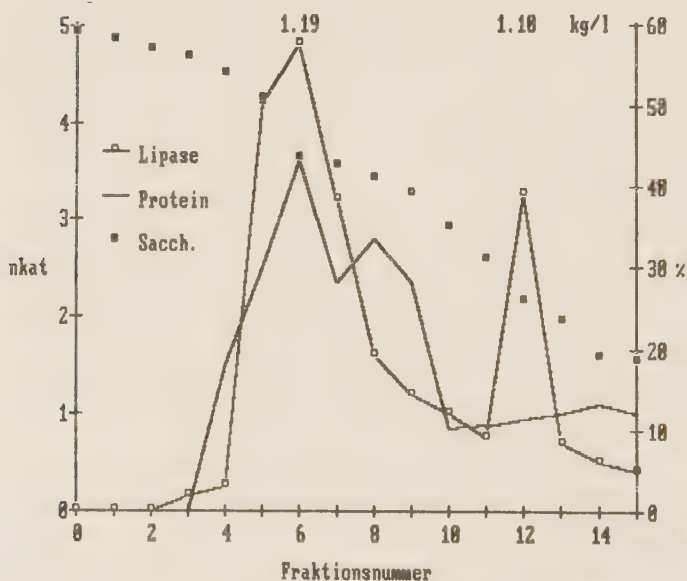


Abb.33: Auftrennung des Acetonpulversediments über SDG

7.2. Gelfiltration der aus dem Acetonpulverse- diment solubilisierten Lipase (Abb.34)

Im Unterschied zur Chromatographie der Lipase über Superose 6 ohne Detergenz (Abb. 26) eluiert die aus dem Sediment des acetongefällten Rohhomogenats mit 5 mmol/l CHAPS solubilisier- te Lipase wesentlich später von der Säule als bei Vorliegen des Enzyms in wäßrigem Milieu. Dies ist vermutlich auf eine geringere Selbstaggregation des Proteins zurückzuführen. CHAPS vermindert offen- sichtlich in dieser Konzentration die Masse des Lipase- polymers von 2 700 KD auf 160 KD (Abb. 29).

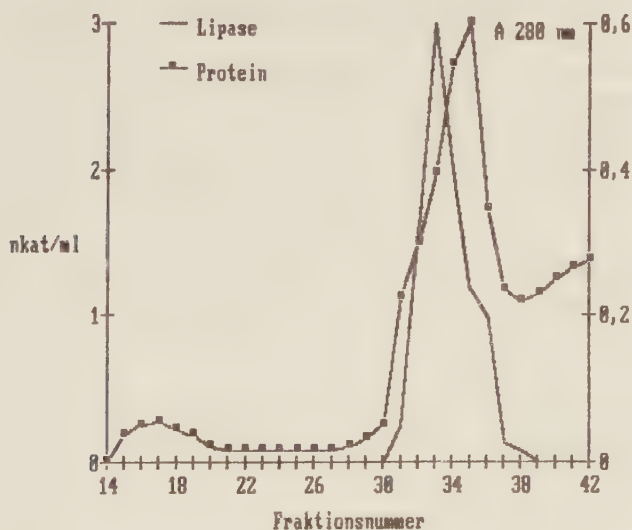


Abb.34: Gelfiltration der aus dem Sediment des acetongefällten Rohhomogenats mit 5 mmol/l CHAPS solubilisierten Lipase (Sorte: "Petra Nova")

Tabelle 27 faßt die partielle Reinigung der Lipase aus dem acetonepulvergefällten Rohhomogenat 4 Tage alter, im Dunkeln gezogener Rapskotyledonen der Sorte "Petra Nova" zusammen. Durch Chromatographie über FPLC-Superose 6 wurde eine vierfache Anreicherung erzielt, wobei 57% der Gesamtaktivität verloren gingen. Eine weitere Reinigung konnte weder über CM-Sephadex noch über DEAE-Sephadex erreicht werden.

Tab.27: Teilweise Reinigung von Lipase aus Kotyledonen drei Tage alter Rapskeimlinge der Sorte "Petra Nova"

Reinig. schritt	Vol. (ml)	Gesamt-akt. (nkat)	Gesamt-protein (mg)	spez. Akt. (nkat/mgP)	Anreich.	Aus-beute %
solubili-						
sierte	8.1	225.2	58.5	3.8	1	100.0
Lipase						
Chromato-						
graphie	2.5	96.0	6.1	15.7	4	42.6
über FPLC-						
Superose 6						
(pool)						

8. Trypsinbehandlung

Um weitere Hinweise zu erhalten, ob die Lipase in membranumgrenzten Kompartimenten eingeschlossen ist oder evtl. Polymere des Enzyms ohne Membranhüllen vorliegen, wurden die lipolytischen Fraktionen aus der Fettschicht ebenso wie das Acetonpulversediment mit Trypsin behandelt. Abbildung 35 zeigt, daß bei der lipolytischen Membranfraktion innerhalb der ersten 20 Minuten die größte Inaktivierung von 65% stattfindet, während in den nächsten 60 Minuten die Aktivität konstant bleibt. Das Ergebnis kann dahingehend gedeutet werden, daß nur ein Teil der Enzymmoleküle nach der Isolierung in Membranvesikeln vor der Protease geschützt vorliegt, während der größte Anteil der Lipase möglicherweise durch Umkehr der Innenseite der Vesikel nach außen zu liegen kommt, und somit von der Protease abgebaut werden kann. Bei der Behandlung des Sediments aus dem Acetonpulverextrakt wird die lipolytische Aktivität sehr rasch reduziert, was als Indiz gewertet werden kann, daß das Enzym in diesem Zustand nicht von einer Membran umhüllt wird.

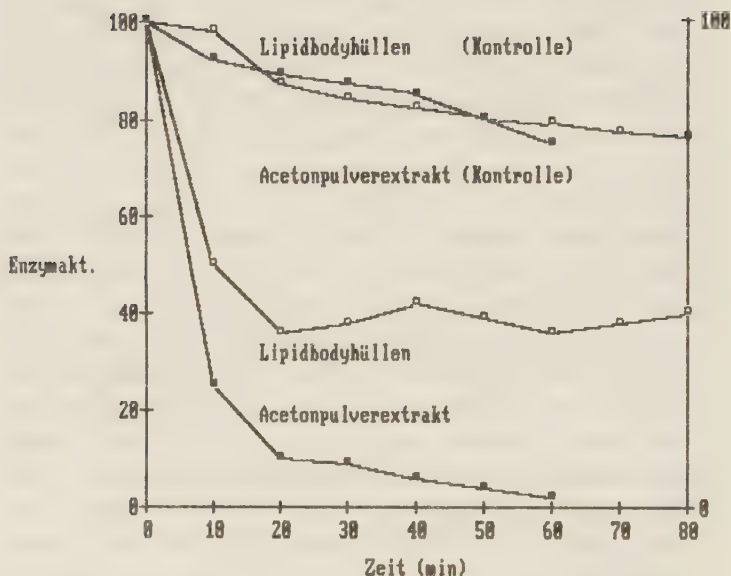


Abb.35: Proteolytische Behandlung der lipolytischen Membranfraktion und des 20 000 x g Acetonpulversediments

Relative Aktivität von 100 entspricht:

41.7 nkat/ml (lipolytische Membranfraktion)

48.4 nkat/ml (Acetonpulversediment)

Kontrolle: Inkubation ohne Trypsin

D. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Vorkommen, Entwicklung, Eigenschaften und intrazelluläre Lokalisation der Lipase aus den Zuchtsorten "Lemkes Diamant", "Raporo", "Akela", "Liragrün", "Lifura" und "Petra Nova" von Raps (*Brassica napus*) untersucht. Die Daten zeigen gravierende Unterschiede bei diesem unmittelbar an der Fettmobilisierung beteiligten Enzym auf und können viele der widersprüchlichen Befunde aus Untersuchungen anderer Laboratorien als sortenspezifische Variabilität erklären.

Zu Beginn der Keimung werden die Fette hydrolysiert und innerhalb weniger Tage in Kohlenhydrate umgewandelt. Der Lipase kommt daher eine wichtige Rolle als einer der ersten Enzymaktivitäten zu, die für das Wachstum des Keimlings essentiell sind. In ruhenden und frisch imbibierten Samen aller untersuchter Rapsvarietäten wurde in Übereinstimmung mit früheren Berichten (Theimer und Rosnitschek, 1978; Fußeder, 1981; Lin und Huang, 1983) jedoch keine Lipaseaktivität gefunden. Das Enzym muß also während der ersten Keimungstage entweder neu synthetisiert und in die Lipidbodies inkorporiert oder aus einem inaktiven in einen aktiven Zustand überführt werden. Eine klare Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten wird aber erst nach der Verfügbarkeit eines monospezifischen Antikörpers gegen die Rapslipase getroffen werden können, wozu die vorliegende Arbeit den Weg öffnen soll.

Beim Mais wurde kürzlich von Wang et al. (1987) die Neusynthese der Lipase an freien, cytoplasmatischen Ribosomen der Zellen des Scutellums nachgewiesen. Allerdings treten bei Gräsern die Speicherfette nur im Scutellum auf und spielen, anders als beim Raps, gegenüber der Stärke des Endosperms eine untergeordnete Rolle als Speichermaterial. Daher können diese Verhältnisse nicht ungeprüft auf die Speichergewebe von Ölsaaten übertragen werden.

Etwa am zweiten Tag nach der Aussaat ist bei allen untersuchten Rapssorten Lipaseaktivität nachweisbar (Abb. 3). Gleichzeitig mit dem Anstieg der lipolytischen Aktivität beginnt *in vivo* auch der Abbau der Reservefette (Abb. 7 u. 8). Auch der Verlauf der Entwicklung der Isocitratlyase, einem Schlüsselenzym des Glyoxylsäurezyklus, folgt bei allen getesteten Rapssorten dem der Lipaseaktivität (Abb. 9). Dies deutet darauf hin, daß der bereits früher von vielen Autoren beschriebene generelle Ablauf der Mobilisierung der Speicherfette durch Züchtungseingriffe nicht verändert wurde (Beevers, 1969; Vigil, 1970; Trelease et al., 1971; Gerhardt, 1978; Warner et al., 1982).

Dagegen differieren der Verlauf der Entwicklung und die Höhe der apparenten Lipaseaktivität trotz gleicher Anzuchtbedingungen bei den einzelnen Rapsvarietäten während der ersten Tage nach Beginn der Keimung erheblich. So erreicht die Lipaseaktivität bei verschiedenen Sorten an unterschiedlichen Keimungstagen ihr Maximum (z.B. "Petra Nova" am 3. Tag, "Lifura" am 5. Tag), außerdem ist die apparente optimale Aktivität der Lipase, z.B. der Sorte "Lemkes Diamant", doppelt so hoch wie die der Sorte "Petra Nova" (Abb. 8). Ob die unterschiedlichen Aktivitäten der einzelnen Cultivare auf etwaigen Verän-

derungen der Konzentrationen an Lipasen beruhen oder ob jeweils Inhibitoren vorliegen wie bei Sojabohnen (Satouchie et al., 1974; Wang und Huang, 1984) und Schlangengurken (Sturm et al., 1985), kann letztlich erst durch immunologische Studien abgeklärt werden. Den Lipasen aller getesteten Sorten ist jedoch gemeinsam, daß sie *in vitro* deutlich höhere lipolytische Aktivitäten aufweisen als für den Abbau der Reservefette *in vivo* notwendig wäre (Tab. 5), was schon von anderen Autoren beobachtet wurde (Rosnitscheck, 1977; Theimer und Rosnitscheck, 1978; Lin und Huang, 1983); dies läßt vermuten, daß zelluläre, bislang unbekannte Regulationsvorgänge die Lipolyse *in vivo* kontrollieren.

Bis dato liegen über die intrazelluläre Lokalisation der Lipase in den Kotyledonen von Rapskeimlingen unterschiedliche Ergebnisse vor. Bei der von Theimer und Rosnitscheck (1978) benutzten Rapsorte ("Lemkes Diamant") verblieben weniger als 5% der gesamten Lipaseaktivität in der Fettschicht. Im Gegensatz dazu fanden Lin und Huang (1983) bei zwei Rapsvarietäten ("Tower" und "Dwarf Essex") 50% der Lipaseaktivität mit den Lipidbodies assoziiert. Bei den 6 in dieser Arbeit getesteten Cultivare bewegt sich der Anteil an Lipaseaktivität in der Lipidschicht je nach Sorte und Pufferkonzentration zwischen 10-50% (Abb. 10a-c). Ohne Puffer oder mit verminderter Pufferkonzentration im EM erhöht sich der Anteil der Lipaseaktivität in der Fettschicht auf 30-70% (Tab. 6a u. b). Allerdings ist offenbar nur eine geringe Menge des Enzyms stärker mit den Lipidbodies assoziiert, da sich der größte Teil durch intensives Waschen bzw. erhöhte Ionenkonzentration leicht wieder ablösen läßt (Tab. 7; Tab. 8). Auch zeigen sich deutliche, reproduzierbare Sortenunterschiede (Abb. 11, 12). Beim Raps scheint die

Lipase somit nicht ein integrales Protein der Lipidbody-Hülle, sondern durch ionische oder andere Bindungskräfte (z.B. über Bindungspeptide; Qu et al., 1986) mit ihr assoziiert, zu sein. Deren Bindungsstellen können natürlich in Zahl und Stärke sortenspezifisch verändert sein, was die unterschiedlichen Daten erklären würde. Jedoch konnte bei keiner der untersuchten Rapskultivare die hohe Festigkeit der Bindung gemessen werden wie sie Lin und Huang (1983) für ihre beiden Rapsorten beschrieben; dort beeinflusste auch eine Veränderung der Ionenkonzentration die Anheftung der Lipase nicht.

Eine Auftrennung der Lipidbodyfraktion im SDG ergibt 2 Gipfel der Lipaseaktivität: einen Hauptgipfel bei einer Schwebedichte von 1.09 kg/l und einen geringeren Anteil bei 1.19-1.20 kg/l (Abb. 13, 14). Die durch Extraktion des Fettes aus gereinigten Lipidbodyfraktionen erhaltenen Hüllen sedimentieren im SDG übereinstimmend bei einer Schwebedichte von 1.19-1.20 kg/l (Abb. 15, 16, 17, 18 und 19). Daher ist anzunehmen, daß die Fettfraktion neben intakten und teilweisen abgebauten Lipidbodies auch noch Lipidbodyhüllen enthält, die von ehemaligen Lipidbodies übrigblieben und an die noch aktive Lipase assoziiert ist. Bei dieser lipolytischen Struktur könnte es sich aber auch um die Membranfortsätze oder Cisternen des Endoplasmatischen Reticulums an den Lipidbodies handeln, die in elektronenoptischen Untersuchungen bei Raps und bei Wassermelonen beschrieben wurden (Wanner und Theimer, 1978; Wanner et al., 1982).

Die Phospholipidzusammensetzung der Fraktionen mit maximaler Lipaseaktivität mit der Schwebedichte 1.19 kg/l ähnelt bei den Rapskultivaren derjenigen mikrosomaler Membranen (Endoplasmatisches Reticulum) und stimmt so mit der Vorstellung der Entstehung von Lipidbodies aus

ER-Membranen (Wanner et al., 1982) und mit früheren Befunden über Lipidbodies von *Ricinus communis* überein (Donaldson, 1972, 1976).

Aus der "löslichen" Lipasefraktion sedimentieren 60-80% der Enzymaktivität während einer 3-stündigen Zentrifugation bei $130\,000 \times g$ (Abb. 20). Das Sediment enthält ebenfalls die beiden lipolytischen Zellstrukturen mit den Schwebedichten 1.09 und 1.19 kg/l (Abb.21 a, b). Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß in den fettabbauenden Zellen der Rapskotyledonen Lipase an Lipidbodies oder evtl. cytoplasmatisch auch an lipidärmere Zellstrukturen gebunden vorkommt, die wahrscheinlich als ehemalige Lipidbody-Hüllen in der Zelle noch überdauern.

Für eine mit den Lipidbodies fest assoziierte Lipase sprechen auch die Experimente, in denen gewaschene Fettfraktionen einer Autolipolyse unterworfen wurden (Tab. 16). Dabei zeigen sich jedoch auch wieder Varietätenunterschiede z.B. in der Menge der freigesetzten Fettsäuren und im pH-Optimum der Aktivität. So entfalten z.B. die Lipidbodies der Sorten "Lemkes Diamant" nur im Alkalischen und die von "Lifura" nur im Sauren Autolipolyse. Diese beiden Varietäten stellen damit eine Ausnahme gegenüber den anderen untersuchten Cultivaren dar, bei denen sowohl im sauren als auch im basischen Milieu jeweils ein Optimum der Autolipolyse gemessen wurde. Die von Lin und Huang (1983) verwendeten Sorten zeigten in der Lipidbodyfraktion im Gegensatz dazu nur im Sauren bei pH 6.5 autokatalytische Lipaseaktivität. Da in dieser Arbeit ebenfalls das von Lin und Huang benutzte Testverfahren (Nixon und Chan, 1979) verwendet wurde, können diese Unterschiede nur durch sortenspezifische Variabilität erklärt werden.

Auch die Substratspezifität der isolierten Lipasen variiert bei den verschiedenen Zuchtsorten des Raps. Alle untersuchten Lipasen bauen (im colorimetrischen Test) die beiden Substrate Trierucin und Trilinolein sowohl im sauren als auch im alkalischen Milieu ab. Nur bei der Varietät "Lifura", einer erucasäurehaltigen Sorte, wird bei pH 6.5 Trierucin um den Faktor 3.5 und Trilinolein um den Faktor 1.5 besser hydrolysiert als bei pH 9.0 (Tab. 15).

Diese Resultate deuten darauf hin, daß die Lipasen der untersuchten Sorten ein Spektrum an Substraten hydrolysieren können. Auch die pH-Optima zeigen diese Variabilität; ähnliche Daten werden auch bei Serumlipasen aus Ratten (Hamosh et al., 1979; Field und Scow, 1983; Roberts et al., 1984; Roberts, 1985), der Pankreaslipase beim Menschen (Kimura et al., 1972) und den mikrobiellen Lipasen von *Candida paralytica* (Ota et al., 1970), von *Mucor lipolytica* (Nagaoka und Yamada, 1973) und von *Chromobacterium* (Yamaguchi et al., 1973) erhoben, die einen noch breiteren pH-Wirkungsbereich, nämlich zwischen pH 2 bis pH 11 zeigen. Diese größeren Variationen in Aktivität, pH-Empfindlichkeit und Substratspezifität der Lipasen der einzelnen Cultivare lassen sich möglicherweise auf die erheblichen züchterischen Maßnahmen in den letzten Jahren zurückführen.

Allerdings muß diese Variabilität nicht unbedingt auf eine Veränderung der Lipasemoleküle durch Züchtung zurückgehen. Auch lokale Bedingungen in den Reaktionsräumen der Lipase können deren Aktivität, Substratspezifität und pH-Abhängigkeit beeinflussen; so sind die ionischen Verhältnisse an der Oberfläche von Micellen und Membranen, dem unmittelbaren Wirkungsort der Lipase, auf Grund der polaren Gruppen von geladenen Detergenz- oder

Phospholipidmolekülen und deren Gegenionen anders als in der umgebenden Lösung (Sandermann, 1983).

Als Beispiel dafür sind in Tab. 28 die bei verschiedenen Rapssorten gefundenen Unterschiede der Lipaseaktivitäten zusammengefaßt, wenn einmal die Freisetzung von Fettsäuren aus den intakten Lipidbodies, ohne extern zugegebenes Substrat, zum anderen die Aktivität dieser Lipidbody-Fraktion gegenüber zugesetztem Trierucin bei den pH-Werten 6.5 und 9.0 gemessen wurde.

Die großen Unterschiede in der Lipaseaktivität bei den beiden Testverfahren können zunächst aufgrund obiger Annahmen die Diskrepanz zwischen dem *in vivo* gemessenen Fettabbau und der um Zehnerpotenzen höheren Aktivität der isolierten Lipase im *in vitro* Test erklären helfen. Darüberhinaus zeigt die Tabelle 28, daß sich mit beiden Meßmethoden markante Aktivitätsunterschiede bei den verschiedenen Rapssorten sowohl in der Gesamtaktivität der Lipase als auch in deren pH-Optimum feststellen lassen. Diese Befunde belegen, daß innerhalb derselben Art durch die Pflanzenzüchtung bei den resultierenden Zuchtsorten auch Stoffwechselaktivitäten beeinträchtigt werden, die nicht zu den Selektionskriterien des Pflanzenzüchters gehören. Widersprüchliche Literaturangaben (z.B. Rosnitschek/Theimer, 1980; Lin/Huang, 1983) über Höhe und Eigenschaften der Lipaseaktivitäten lassen sich damit erklären. Die zellphysiologischen und molekularbiologischen Grundlagen für derartige Veränderungen sind allerdings noch unbekannt; ihre Aufklärung dürfte aber wertvolle Hinweise auf die Regulation der Lipasen und allgemein die pflanzliche Entwicklung geben.

Tab. 28:

Substrat	"In vitro"-Lipase-Test			"In vitro"-Autolipolyse intakter Lipidbodies endogenes Rapsöl		
	Trierucin					
Sorte	pH 6.5	9.0	6.5/9.0	6.5	9.0	6.5/9.0
			nkat/gFg			
			nkat/gFg			
"Raporo"	9	24	0.38	0.16	0.07	2.3
"Akela"	24	21	1.14	0.21	0.08	2.6
"Liragrün"	5	9	0.55	0.03	0.01	3.0
"Lifura"	14	4	3.5	0.06	0.0	-
"Lemkes D."	0	26	0.0	0.0	0.15	0.0
"Petra N."	6	19	0.66	0.03	0.08	0.37

Allen getesteten Rapsorten ist jedoch gemeinsam, daß die optimale Lipolyse sich in einem Temperaturbereich von 30-40°C bewegt. Bei 60°C ist im Unterschied zu vielen mikrobiellen Lipasen (Saiki et al., 1969; Yamaguchi et al., 1973; Iwai und Tsujisaku, 1974) keine der Lipasen mehr aktiv (Abb. 24 und 25). Der Einsatz der Rapslipasen z.B. in Waschmitteln ist daher schon aufgrund dieser Eigenschaften z. Zt. nicht sinnvoll, selbst wenn es gelänge, sie wirtschaftlich z.B. aus lipasereichen Zuchtsorten zu gewinnen.

Deutliche Sortenunterschiede zeigen sich dagegen wieder in der Wirkung von Thiolgruppen und Detergentien auf die Lipaseaktivitäten. Innerhalb einer Sorte weisen beide lipolytischen Zellfraktionen dabei gleiches Verhalten auf, was darauf hinweist, daß es sich sowohl um ein und dasselbe Enzym in unterschiedlichen Zellstrukturen handelt.

Die nichtionischen Detergentien Digitonin und Triton X-100 (CMC = 0.3 mmol/l) hemmen die Lipasen der vier untersuchten Sorten ("Petra Nova", "Akela", "Lemkes Diamant" und "Raporo") bereits in geringen Konzentrationen. CHAPS (CMC = 1.4 mmol/l) und n-Octyl-Glucosid (CMC = 25 mmol/l) dagegen wirken bei ihrer kritischen Micellkonzentration (CMC) nicht als Lipaseinhibitoren. Oberhalb des CMC-Wertes bilden die Detergentien Micellen, die die Lipasen der untersuchten Cultivare vermutlich von der Fett/Wasserphase verdrängen und somit ihre Aktivitäten mindern oder sogar vollständig hemmen können (Tab. 21 u. 22).

Dagegen hemmen SH-Gifte wie p-HMB und p-CMPS und der Komplexbildner EDTA die lipolytischen Aktivitäten, z.B. bei "Lemkes Diamant" und "Raporo", schon in geringsten Konzentrationen, während bei "Petra Nova" und "Akela" erst durch 50 mmol/l EDTA eine 90-95%ige, durch 4 mmol/l p-CMPS eine 20-30%ige, Verminderung der Aktivität zu beobachten ist (Tab. 17, 18, 19 u. 20). Auch die Maislipase wird von Sulfhydryl-Giften in ihrer Aktivität nicht gehemmt, weil sie keine SH-haltigen Aminosäuren besitzt (Lin und Huang, 1984). Aus diesem Umstand läßt sich die Vermutung ableiten, daß die eventuell vorhandenen SH-haltigen Aminosäuren bei "Petra Nova" und "Akela" im Unterschied zu "Lemkes Diamant" und "Raporo" für die katalytische Wirkung des Enzyms ohne Bedeutung sind.

Eine endgültige Entscheidung ist jedoch nur über den Vergleich der Aminosäuresequenzen der Lipasen möglich.

Der erste Schritt dazu ist die Reindarstellung der Lipase. Als Sorte bot sich "Petra Nova" an, weil bei der Solubilisierung des Enzyms aus dem Acetonpulverextrakt

und den Lipidbodyhüllen, durch die verwendeten Detergenzkonzentrationen von n-Octyl-Glucosid und CHAPS, die Aktivität weniger gehemmt wurde als bei den anderen Cultivaren (Tab. 21).

Allerdings sind die durch Detergentien aus dem Sediment des acetongefällten Rohhomogenats solubilisierten Lipaseaktivitäten so gering, daß eine Isolierung auf diese Weise unverhältnismäßig aufwendig erscheint (Tab. 25, 26, 27). Auch die Reinigung aus isolierten Lipidbodies wie bei Lin und Huang (1984) ist aufgrund der relativ losen Bindung der Lipase an die Lipidbodies nur mit einer 4%igen Ausbeute verbunden (Tab. 24) und dürfte zur Gewinnung von Antisera wenig geeignet sein. Erst durch Fällung des Rohhomogenats frisch geernteter Keimlinge mit 40%igem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit anschließender Gelfiltration und unter Ausnutzung des lipophilen Charakters der Lipase gelang die Reinigung durch hydrophobe Chromatographie über n-Octyl-Sepharose (Abb. 26, 27, 28; Tab. 23), während bei gleichen Versuchsbedingungen keine Bindung des Enzyms an Phenyl-Sepharose beobachtet werden konnte. Die Erklärung dürfte im höher hydrophoben Charakter der Octylkette im Vergleich zur Phenylgruppe liegen. Es liegt jedoch auf der Hand, daß Lipasen hydrophoben Charakter besitzen. Diese Eigenschaft kann erklären, warum in der Gelfiltration verschiedene hochmolekulare Aggregate auftreten, z.B. 2 700 KD im Rohhomogenat aus Kotyledonen frisch geernteter Keimlinge oder 160 KD bei acetongefälltem Rohextrakt (Abb. 29). Diese polymeren Komplexe dürften wahrscheinlich Artefakte darstellen, die bei der Isolierung in hydrophilem Medium entstehen.

Lipasen pflanzlicher, mikrobieller und tierischer Herkunft sind dafür bekannt, in wässrigem Milieu Selbstaggregat zu bilden. Maislipase lagert sich zu Molekülkom-

plexen mit der Masse von 270 KD und 800 KD zusammen (Lin und Huang, 1984), die von *Vernonia anthelmintica* (Olney et al., 1968) und *Staphylococcus aureus* (Rollof et al., 1987) bilden Polymere von 200 KD bzw. 110 KD. Auch Rattenlipase (Hamosh et al., 1979; Field und Scow, 1983; Roberts et al., 1984) und Pankreaslipase beim Menschen (Kimura et al., 1972) aggregieren zu Polymeren, deren Massen in wässriger Lösung größer als 500 KD, in Gegenwart von Aceton bzw. Detergentien 300 KD, 51 KD und 45 KD sind. In welchem Aggregatzustand die Lipase *in vivo* vorliegt, kann natürlich anhand der hier gewonnenen Daten nicht entschieden werden.

Die Lipase aus Rapskotyledonen der Sorte "Petra Nova" besitzt ein Monomer mit der Molekülmasse von 67 KD (Abb. 28, 30). Auch bei der partiellen Isolierung aus den Lipidbodyhüllen und dem Acetonpulverextrakt zeigt sich in der SDS-PAGE eine Hauptproteinbande bei annähernd 67 KD (Abb. 31). Die Molekülmasse der Rapslipase, der Maislipase mit 65 KD (Lin und Huang, 1984) und der glyoxysomalen Lipase von *Ricinus communis* mit 62 KD (Maeshima und Beevers, 1985) sind daher sehr ähnlich, während die glyoxysomale Lipase aus Erdnußkotyledonen nur 50 KD (Bligny und Douce, 1978) und die aus Reiskleie gar nur 35 KD besitzt (Aizono et al., 1976). Im scheinbaren Widerspruch zu den Daten über die Lokalisierung der Lipaseaktivität in den Lipidbodyhüllen der Sorte "Petra Nova" (Abb. 31) sind die in Abb. 32 dargestellten Elektropherogramme der Lipidbodyhüllen der Cultivare "Liragrün", "Akela" und "Petra Nova". Bei allen untersuchten Varietäten ist ein mehr oder weniger unterschiedliches Muster mit Peptiden zwischen 12-50 KD erkennbar; ein Protein mit der Molekülmasse der Lipase ist bei der Gewinnung der Lipidbodyhüllen nicht nachweisbar. Die Lipase könnte möglicher-

weise leicht abdissoziierbar sein, wobei ihre Aktivität in der Chloroform/Methanolphase zerstört wird, da weder mit dem titrimetrischen noch mit dem colorimetrischen Test Lipaseaktivität meßbar ist. So ist z.B. eine Solubilisierung der Lipase aus den Lipidbodyhüllen mit hoher Ionenkonzentration (1 mol/l) zu 60 %, mit Diethylether zu 95% möglich, d.h., die Rapslipasen liegen anscheinend über ionische und nichtionische Kräfte an die Lipidbodyhüllen gebunden vor. Die Peptide der Lipidbodyhüllen könnten Bindungs- und Akzeptorfunktion besitzen. Qu et al. (1986) machen ein Protein in den Lipidbodyhüllen von Mais dafür verantwortlich.

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten lassen sich zusammen mit neueren Ergebnissen aus der Literatur zwanglos in ein neues Bild von der intrazellulären Lokalisation und der Regulation der Entwicklung der Lipase einfügen (Abb. 36).

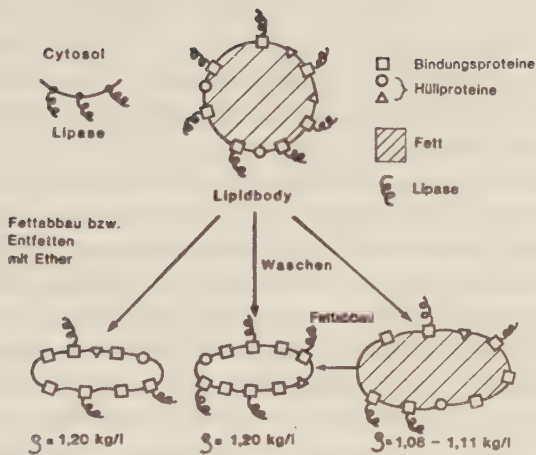


Abb.36: Modell zur intrazellulären Lokalisation der Lipase und zum Fettabbau

Auch die quantitativen Unterschiede bei den einzelnen Rapssorten lassen sich mit folgender Arbeitshypothese erklären:

Bei Keimungsbeginn erfolgt die Neusynthese der Lipase an freien, cytoplasmatischen Ribosomen (Wang und Huang, 1987). Anschließend wird sie aus dem Cytosol heraus an die Lipaserezeptoren der Lipidbodyhüllen gebunden, um von dort aus die Fetthydrolyse durchführen zu können (Qu et al., 1986). Die mehr oder weniger lose Bindung des Enzyms an die Lipidbodyhüllen bei den verschiedenen Varietäten dürfte Ursache für die unterschiedlichen *in vitro*-Lipaseaktivitäten sein (Tab. 7, 8; Abb. 11, 12). Die wesentlich niedrigeren *in vivo*-Aktivitäten jedoch lassen

vermutlich auf endogene Regulationsvorgänge schließen (Tab. 5). Die Reinigung der Lipase ist mit einem Aktivitätsverlust gekoppelt, da möglicherweise zusätzliche Bindungsfaktoren für ihr Wirken in natürlicher Umgebung notwendig sind (Tab. 23).

Die beim Waschen der Fettschicht erhaltenen lipolytischen Strukturen mit der Dichte von 1.20 kg/l stellen wahrscheinlich die Hüllen der schon vollständig durch den Fettabbau entleerten Lipidbodies dar. Diese Hüllen können auch durch Herauslösen der Fette mit organischen Lösungsmitteln wie Diethylether und Chloroform/Methanol isoliert werden. Bei den lipolytischen Strukturen mit der geringeren Dichte handelt es sich wahrscheinlich um noch nicht gänzlich abgebaute Lipidbodies (Abb. 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19; Tab. 9). In niederionischen, hydrophilem Milieu sind die Lipasen relativ fest gebunden, so daß sie auch nach dem Fettabbau an den Lipidhüllen haften bleiben (Tab. 16; Abb. 23a, b). Der Einfluß der Pflanzenzüchtung wirkt sich anscheinend sowohl auf die Proteineigenschaften der Lipase als auch auf die Bindungsproteine aus, was eine breite Streuung der Aktivitätsunterschiede bei den Sorten erklären könnte (Abb. 7 u. 8).

Aufgrund vorliegender Daten (Wang und Huang, 1987) stellen Lipasen höherer Pflanzen ein amphipathisches Molekül dar, mit einem hydrophilen Teil, der zum Cytosol gerichtet ist, und mit einem hydrophoben Teil, der durch die Lipidbodyhülle ins Innere zu den Lipiden reicht. Die von der Lipase freigesetzten Fettsäuren könnten somit möglicherweise durch eine Art Tunnel die Lipidbodies verlassen, wobei sie sich mit dem lipophilen Schwanz nach innen und mit dem polaren Ende nach außen orientieren und so von den Glyoxysomen aufgenommen werden könn-

ten, in denen sie dann durch β -Oxidation abgebaut werden.

Zur Überprüfung der Hypothese ist als nächster Schritt die Gewinnung von Antikörper gegen Lipase notwendig, um die Biogenese und den Bindungsmodus des Enzyms studieren zu können. Durch die *in vitro*-Proteinsynthese der Lipase können Ort und Zeitpunkt der Bildung des Enzyms nachgewiesen werden und ein Vergleich mit der nativen Lipase wäre möglich. Auch der Transfermodus der neusynthetisierten Lipase zu den Lipidbodies könnte einer Klärung näher gebracht werden. Bindungsstudien der *in vitro* gewonnenen Lipase an Lipidbodyhüllen aus gekeimten Kotyledonen, an Lipidbodies aus ungekeimten und aus gekeimten Kotyledonen könnten weitere Aufschlüsse über die Art der Bindung der Lipase an die Lipidbodies geben.

Die Erzeugung von Varietäten innerhalb einer Art mit gewünschten Eigenschaften ist durch Pflanzenzüchtung und moderne Gentechnologie möglich geworden. Jedoch zeigen die in dieser Arbeit gewonnen Daten, daß durch Züchtungseingriffe offensichtlich daneben auch Stoffwechselaktivitäten verändert werden können, die nicht zu den Auswahlkriterien gehören und deren Folgen bei zukünftig neuen Sorten eventuell beachtet werden müssen.

E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Vorkommen, Entwicklung, Eigenschaften und intrazelluläre Lokalisation der Lipasen aus den Zuchtsorten "Lemkes Diamant", "Raporo", "Akela", "Liragrün", "Lifura" und "Petra Nova" von Raps untersucht.

1. In Homogenaten ruhender Rapssamen aller untersuchten Sorten kann keine lipolytische Aktivität nachgewiesen werden. Erst am 2. Keimungstag tritt meßbare Lipaseaktivität auf, die je nach Varietät zwischen dem 3. und 5. Tag ihr Maximum erreicht, um in den folgenden Tagen wieder aus dem Gewebe zu verschwinden. Trotz gleicher Anzuchtbedingungen differieren die apparenten Lipaseaktivitäten der einzelnen Sorten während des Keimungsverlaufs. Die Lipasen aller Cultivare weisen deutlich höhere *in vitro*-Aktivitäten auf als gemäß dem Verschwinden des Reservefettes aus dem Gewebe notwendig wäre.
2. Die Verteilung der Lipaseaktivitäten nach einer 27 000 x g Zentrifugation des Rohhomogenats aus Kotyledonen frisch geernteter Rapskeimlinge unterscheidet sich bei den getesteten Varietäten je nach Pufferkonzentration im Extraktionsmedium. Ohne Puffer oder mit verminderter Pufferkonzentration variiert der Anteil der gesamten Lipaseaktivität des Rohhomogenats in den Fettfraktionen des jeweiligen Cultivars zwischen 30-70%. Bei erhöhter Puffer- und Ionenkonzentration im Extraktionsmedium wird die Lipaseaktivität in der Fettfraktion durch Waschen um 60-90% vermindert.

3. Die Lipasen sind an Membranstrukturen assoziiert, die aus einer gereinigten Lipidbodyfraktion durch einstündige Zentrifugation bei 130 000 x g gewonnen und im linearen Saccharosedichtegradienten in zwei Fraktionen unterschiedlicher Dichte aufgetrennt werden können: eine Hauptfraktion mit der Dichte 1.09 kg/l und eine Nebenfraktion von 1.20 kg/l. Zentrifugiert man dagegen die Hüllen entfetteter Lipidbodies bei 130 000 x g, so sedimentiert bei allen untersuchten Sorten eine lipasetragende Membranstruktur im linearen Saccharosedichtegradienten nur bei einer Dichte von 1.19-1.20 kg/l. Die nach dem Aufschluß der Koryledonon im 27 000 x g Überstand befindliche lipolytische Aktivität sedimentiert nach einstündiger Zentrifugation bei 130 000 x g und pendelt sich im linearen SDG mit einem Hauptgipfel bei 1.09 kg/l und einem Nebengipfel bei 1.20 kg/l ein . Die Bindungsfestigkeit der Lipase an die Lipidbodies weist von Varietät zu Varietät quantitative Unterschiede auf.
4. Isolierte und gereinigte Lipidbodies aller untersuchten Varietäten unterliegen zwar einer Autolipolyse, jedoch bestehen sortenspezifische Unterschiede. So entfalten z.B. die Lipidbodies des Cultivars "Lemkes Diamant" nur im Alkalischen, die von "Lifura" nur im Sauren, die restlich untersuchten Sorten sowohl im sauren als auch im alkalischen Milieu Autolipolyse. Auch die Substratselektivität variiert bei den jeweiligen Zuchtsorten des Raps. So hydrolysiert z.B. (im titrimetrischen Test) die mit den Lipidbodies assoziierte Lipase von "Liragrün" im Alkalischen Rapsöl und Trierucin besser als Sonnenblumenöl; die von "Raporo"

bevorzugt Sonnenblumen- gegenüber Rapsöl und Trierucin. Alle untersuchten Lipasen bauen (im colorimetrischen Test) die beiden Substrate Trierucin und Trilinolein sowohl im Sauren als auch im Alkalischen ab. Nur bei der Varietät "Lifura" wird Trierucin und Trilinolein bei pH 6.5 besser hydrolysiert als bei pH 9. Die Lipasen aller verwendeten Varietäten werden von Komplexsalzen wie EDTA und von Detergentien wie Digitonin und Triton X-100 in geringsten Konzentrationen gehemmt, während n-Octyl-Glucosid und CHAPS erst in höheren Konzentrationen hemmend wirken. SH-Gifte inaktivieren Lipasen von "Petra Nova" und "Akela" erst bei 4 mmol/l; die von "Lemkes Diamant" und "Raporo" schon bei wesentlich geringeren Konzentrationen.

5. Die Lipase von "Petra Nova" wurde aus dem Kohhomogenat von frisch geernteten, 4 Tage alten Kotyledonen durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung, Chromatographie über FPLC-Superose 6 und n-Octyl-Sepharose in 55-facher Anreicherung mit elektrophoretischer Homogenität gewonnen. Die Lipase bildet je nach Hydrophilie des Milieus Polymere. Die Molekülmasse des Monomers beträgt 67 KD.
6. Aufgrund der erhobenen Resultate wird auf der Basis von Literaturdaten folgendes Modell zur intrazellulären Lokalisation der Lipase in den fettspeichernden Kotyledonen von Ölsaaten vorgeschlagen:

Zu Beginn der Keimung erfolgt eine *de novo*-Synthese der Lipase im Cytosol. Anschließend wird sie an Lipaserezeptoren der Lipidbodyhüllen gebunden, um von dort aus den Fettabbau zu übernehmen. Züchtungsbedingte Variationen in diesen Rezeptorpeptiden sowie

möglicherweise auch im Lipasemolekül bedingen die Unterschiede in Aktivität, Substratspezifität und anderen Eigenschaften der Lipasen bei den einzelnen Rapsorten.

F. Literaturverzeichnis

- Aizono, Y., M. Funatsu, K. Hayashi, M. Watanabe, Y. Eto (1976). Purification and characterization of rice bran lipase. *Agr. Biol. Chem.* **40**, 317-324.
- Appelqvist, L., A. (1971). Composition of seeds of cruciferous oil crops. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **48**, 851-859.
- Beevers, H. (1969). Glyoxysomes of castor bean endosperm and their relation to gluconeogenesis. *Annals of the N.Y. Acad. Sci.* **168**, 313 - 324.
- Baxter, D.E. (1984). Recognition of two lipases from barley and green malt. *J. Inst. Brew.* **90**, 277-281.
- Bergfeld, B., Y.N. Hong und P. Schopfer (1978). Formation of oleosomes during embryogenesis and their breakdown during seedling development in cotyledons of *Sinapis alba* L. *Planta* **143**, 297-307.
- Bligny, R. und R. Douce (1978). Calcium-dependent lipolytic acylhydrolase activity in purified plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **529**, 419- 428.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein in utilizing the pinciple of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

- Crider, Q.E., P. Alaupovic, J. Hillsberry und R. Bradford (1964). Separation of lipids by Silica Gel G column chromatography. J. Lipid Res. 5, 479-481.
- D'Alonzo, R.P., W.J. Kozarek und R.L. Wade (1982). Glycerid composition of processed fats and oils as determined by capillary gas chromatography. J. Amer. Oil Chem. Soc. 59, 292-295.
- Dixon, G.H. und H.S. Kornberg (1959). Assay methods for the enzymes of the glyoxylate cycle. J. Biochem. 72, 3.
- Desnuelle, P. und P. Savary (1963). Specification of lipase. J. Lipid Res. 4, 369-384.
- Donaldson, R.P., N.E. Tolbert und C. Schnarrenberger (1972). A comparison of microbody membranes with microsomes and mitochondria from plant and animal tissues. Arch. Biochem. Biophys. 152, 199-215.
- Donaldson, R.P. (1976). Membrane lipid metabolism in germinating castor bean endosperm. Plant Physiol. 57, 510-517.
- Field, R. und R.O. Scow (1983). Purification and characterization of rat lingual lipase. J. Biol. Chem. 258, 14563-14569.
- Fußeder, A. (1981). Untersuchungen zu Entwicklung und Eigenschaften von Lipasen und Glyoxysomen in reifen und keimenden Ölsamen. Dissertation, Botanisches Institut der Universität München.

- Gerhardt, B. und H. Beevers (1970). Developmental studies on glyoxysomes in *Ricinus*-endosperm. *J. Cell. Biol.* **44**, 94-102.
- Gerhardt, B. (1978). Microbodies/Peroxisomes pflanzlicher Zellen. *Cell Biology Monographs*, Vol. 5, Springer-Verlag
- Greenwood, J. und M.J. Chrispeels (1985). Immunocytochemical localization of phaseolin and phytohemagglutinin in the endoplasmic reticulum and golgi complex of developing bean cotyledons. *Planta* **164**, 295-302.
- Gruber, P.J., R.N. Trelease, W.M. Becker und E.H. Newcomb (1970). A correlative ultrastructural and enzymatic study of cotyledonary microbodies following germination of fat-storing seeds. *Planta* **93**, 269-288.
- Guibault, G.G. und J. Hieserman (1969). Fluorometric substrate for sulfatase and lipase. *Anal. Chem.* **41**, 2006-2009.
- Hamosh, M., D. Ganot und P. Hamosh (1979). Rat lingual lipase. Characteristics of enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **254**, 1221-12125.
- Hasson, E. P. und C.G. Laries (1976). Separation and characterization of potato lipid acylhydrolases. *Plant Physiol.* **57**, 142-147.

- Hayase, K. und A.L. Tappel (1970). Specificity and other properties of lysosomal lipase of rat liver. J.Biol. Chem. **245**, 169-175.
- Herman, E.M. und L.M.Shannon (1984). Immunocytochemical localization of concanavalin A in developing jack-bean cotyledons. Planta **161**, 97-104.
- Herman, E.M., (1987). Immunogold localization and synthesis of an oilbody membrane protein in developing soybean seeds. Planta **172**, 336-345.
- Hock, B. und C. Gietl (1982). Cell-free synthesis of watermelon glyoxysomal malate dehydrogenase: A comparison with the mitochondrial isoenzyme. In: Peroxisomes and Glyoxysomes (P. Lazarow, H. Kindl, eds.), Annals of the N.Y. Acad. Sci. Vol. **386**, 350-361.
- Hockeborn, M. und W. Rick (1982). Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Lipase mit dem kontinuierlichen titrimetrischen Test. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **20**, 773 - 785.
- Huang, A.H.C. und R.A. Moreau (1978). Lipases in the storage tissues of peanut and other oil seeds during germination. Planta **141**, 111-116.
- Junge, W. (1984). Pancreatic lipase, titrimetric method. (In: H.U.Bergmeyer, ed., 3rd edition: Methods of enzymatic analysis), Vol IV pp. 15-23, Verlag Chemie GmbH Weinheim.

- Iwai, M. und Y. Tsujisaku (1974). The purification and properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemer*. Agr. Biol. Chem. **38**, (6), 1241-1247
- Kimura, H., T. Kitamara und M. Tsuji (1972). Studies on human pancreatic lipase. Biochim. Biophys. Acta **270**, 307-316.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature **227**, 680-685.
- Lin, Y.H., R.A. Moreau und A.H.C. Huang (1982). Involvement of glyoxysomal lipase in the hydrolysis of storage triacylglycerols in the cotyledons of soybean seedlings. Plant Physiol. **70**, 108-112.
- Lin, Y. H., L.T. Wimer und A.H.C. Huang (1983). Lipase in the lipid bodies of corn scutella during seedling growth. Plant Physiol. **73**, 460-463.
- Lin, Y.H. und A.H.C. Huang (1983). Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedlings. Arch. Biochem. Biophys. **225**, 360-369.
- Lin, Y.H. und A.H.C. Huang (1984). Purification and initial characterization of lipase from the scutella of corn seedlings. Plant Physiol. **76**, 719-722.
- Lin, Y.H., C. Yu und A.H.C. Huang (1986). Substrate specificities of lipases from corn and other seeds. Arch. Biochem. Biophys. **224**, 346-356.

- Lord, J.M., F. Kagawa, T.S. Moore und H. Beevers (1973).
Endoplasmic reticulum as the site of lecithin formation in castor bean endosperm. J. Cell. Biol. 57, 659-667.
- Lück, H. (1965). Catalase: In: H.U. Bermeyer, ed., Methods of enzymatic analysis, 885. Acad. Press, N.Y.
- Lutzenberger, A. (1985). Substratabhängige Regulation und Verlauf der Glyoxysomenbildung bei pflanzlichen Zellsuspensionskulturen. Dissertation, Botanisches Institut der Universität München.
- Maeshima, M. und H. Beevers (1985). Purification and properties of glyoxysomal lipase from castor bean. Plant Physiol. 79, 489-493.
- Mariott, K.M. und D.H. Northcote (1975). The induction of enzyme activity in endosperm of germinating castor bean seeds. Biochem. J. 152, 65-70.
- Mirault, M.E. und K. Scherrer (1971). Isolation of peribosomes from HeLa cells and their characterization by electrophoresis on uniform and exponential-gradient-polyacryamide gels. Eur. J. Biochem. 23, 372-386.
- Moore, T.S., J.M. Lord, T. Kagawa und H. Beevers (1973). Enzymes of phospholipid metabolism in the endoplasmic reticulum of castor bean endosperm. Plant Physiol. 52, 50-53.

- Moreau, R., K.D.F. Liu und A.H.C. Huang (1980). Spherosomes of castor bean endosperm. *Plant Physiol.* **65**, 1176-1180.
- Muto, S. und H. Beevers (1974). Lipase activities in castor bean endosperm during germination. *Plant Physiol.* **54**, 23-28.
- Nagaoka, K. und Y. Yamada (1973). Purification of *Mucor*-lipases and their properties. *Agr. Biol. Chem.* **37**, 2791-279.
- Nixon, M. und S.H.P. Chan (1979). A simple sensitive colorimetric method for determination of longchain free fatty acids in subcellular organelles. *Anal. Biochem.* **97**, 403-409.
- Olney, C.E., R.G. Jensen, J. Sampugna und J. Quinn (1968). Lipids **3**, 498, zitiert in "Lipolytic enzymes" (Brockerhoff und Jensen, eds.) p. 133 Acad. Press, New York.
- Ory, R. L., L.Y. Yatsu und H.W. Kirchner (1968). Association of lipase activity with the spherosomes of *Ricinus communis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **123**, 255-264.
- Ory, R.L. (1969). Acid lipase of the castor bean. *Lipids* **4**: 177-185.
- Ory, R. und A.J. St. Angelo (1971). Lipolysis in castor bean seeds: a reinvestigation of the neutral lipase. *Lipids* **6**, 54-59.

- Ota, Y., T., Nakamiya und K., Yamada (1970). Lipase from *Candida paralytica*. Purification, some properties and modification of the purified enzyme with the concentrated solution of sodium chlorid. Agr. Biol. Chem. **34**, 1368-1374.
- Peled, N. und M.C. Krenz (1981). A new assay of microbial lipases with emulsified trioleoyl glycerol. Anal. Biochem. **112**, 219-222.
- Petitou, M., F. Tuy und C. Rosenfeld (1978). A simplified procedure for organic phosphorus determination from phospholipids. Anal. Biochem. **91**, 350-353.
- Racker, E., (1950). Spectrophotometric measurement of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids. Biochem. Biophys. Acta **4**, 211-214.
- Rollof, J. S.A. Hedström und P. Nilsson-Ehle (1987). Purification and characterization. of a lipase from *Staphylococcus aureus*. Biochim. Biophys. Acta **921**, 364-369.
- Qu, R., S. Wang, Y.Lin, V.B. Vance und A.H.C Huang (1986). Characteristics and biosynthesis of membrane proteins of lipid bodies in scutella of maize (*Zea mays* L.). Biochem. J. **253**, 57-65.
- Rest, J.A. und J.G. Vaughan (1972). The development of protein and oil bodies in the seed of *Sinapis alba* L. Planta **105**, 245-262.

- Rick, W. (1969). Kinetischer Test zur Bestimmung der Serumlipaseaktivität. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 7, 530-539.
- Riezman, H., E. M. Weir, C. J. Leaver, D. E. Titus und W. M. Becker (1980). Regulation of glyoxysomal enzymes during germination of cucumber. 3. *In vitro* translation and characterization of four glyoxysomal enzymes. Plant Physiol. 65, 40-46.
- Roberts, J. M., R.K. Montgomery und C.C. Martin (1984). Rat lingual lipase: partial purification, hydrolytic properties, and comparison with pancreatic lipase. Am. J. Physiol. 247, 385-393.
- Roberts, J.M. (1985). Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl butyrate: A convenient and sensitive fluorescent assay for lipase activity. Lipids 20, 243-247.
- Rosnitschek, I. (1977). Untersuchungen über Regulation, intrazelluläre Lokalisation und Eigenschaften der Lipase in den Kotyledonen von Rapskeimlingen (*Brassica napus*). Dissertation, Botanisches Institut der Universität München.
- Rosnitschek, I. und R.R. Theimer (1980). Properties of a membrane-bound triglycerid lipase of rape seed cotyledons. Planta 148, 193-198.
- Roughan, P.G. und C.R. Slack (1982). Cellular organisation of glycerolipid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 33, 97-132.

- Rouser, G., S. Fleischer und A. Yamamoto (1969). Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* Vol 5, 494-496.
- Saik, T., Y. Takagi, T. T. Suzuki, T. Narasaki, G. Tamura und K. Arima (1969). Studies on the lipoprotein lipases of microorganismen (*Mucor javanicus*). *Agr. Biol. Chem.* 33, 3, 414-423.
- Sadar, M.H. und G. Ayranci (1978). Transient-phase and steadystate kinetics of lipase-catalyzed ester hydrolysis. *J. Environ. Sci. Health, B* 13, 117-129.
- Satouchi, K. und S. Matsushita (1976). Purification and properties of a lipase inhibiting protein from soybean cotyledons. *Agr. Biol. Chem.* 40, 889-897.
- Sandermann, H. (1983). *Membranbiochemie. Eine Einführung.* Springer-Verlag, Berlin.
- Schnarrenberger, C., A. Oeser und N.E. Tolbert (1971). Development of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean endosperm during germination. *Plant Physiol.* 48, 566-574.
- Schwarzenbach, A. M. (1971). Observations on spherosomal membranes. *Cytobiol.* 4, 145-147.
- Skipsi, V.P. und M. Barclay (1969). Thin layer chromatography. In "Methods in Enzymology" (ed. J.M. Lowenstein), Vol. XIV, pp. 530-598.

- Smith, C.G. (1974). The ultrastructural development of spherosomes and oil bodies in the developing embryo of *Crambe abyssinica*. *Planta* 119, 125-142.
- Smolenski, G. und S. Lewack (1974). The role of lipase in the germinating of dormant apple embryos. *Planta* 116, 361-370.
- Sommer, I. (1979). Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation der Lipase in den Kotyledonen von Rapskeimlingen (*Brassica napus*). Zulassungsarbeit, Botanisches Institut der Universität München.
- Stahl, E. (1967). Dünnschichtchromatographie. p. 350. Springer-Verlag, Berlin.
- St. Angelo, A.J. und A. Altschul (1964). Lipolysis and the free fatty acid pool in seedlings. *Plant Physiol.* 39, 880-883.
- Stobart, A.K. und S. Stymne (1985). The regulation of the fatty-acid composition of the triacylglycerols in microsomal preparations from avocado mesocarp and the developing cotyledons of safflower. *Planta* 163, 119-125.
- Stymne, S. und A.K. Stobart (1984). The biosynthesis of triacylglycerols in microsomal preparations of developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochem. J.* 220, 481-488.

- Stymne, S. und A.K. Stobart (1985). Oil synthesis *in vitro* in microsomal membranes from developing cotyledones of *Linum usitatissimum* L. *Planta* **164**, 101-104.
- Stumpf, P.K. (1976). Lipid metabolism. In: Plant biochemistry, pp. 427-461. (J.Bonner, J.E.Varner, eds.)
- Sturm, A, A.K. Schwennesen und H. Kindl (1985). Isolation of proteins assembled in lipidbody membranes during fat mobilization in cucumber cotyledons. *Eur. J. Biochem.* **150**, 461-468.
- Tavener, R.J.A. und D.L Laidman (1972). The induction of triglycerid metabolism in the germinating wheat grain. *Phytochemistry* **11**, 989-997.
- Theimer, R.R. und J. Rosnitschek (1978). Development and intracellular localization of lipase activity in rape seed cotyledons. *Planta* **139**, 249-256.
- Tolbert, N.E. (1971). Microbodies-peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **22**, 45-74.
- Trelease, R.N., P.J. Gruber und E.N.Newcomb (1971). Microbodies (glyoxysomes and peroxisomes) in cucumber cotyledones. Correlative biochemical and ultra structural study in light- and dark grown seedlings. *Plant Physiol.* **48**, 461-475.

- Trelease, R.N., P.J. Gruber, W. M. Becker und E. N. Newcomb (1971). Microbodies in fat-storing cotyledons: Ultrastructural and enzymatic changes during greening In: Photosynthesis and photorespiration (Hatch, M. D. et al., eds.), pp. 523-533. Wiley - Intersciences New York.
- Vigil, E. L. (1970). Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J. Cell Biol.* **46**, 435-454.
- Wahlefeld, A.W. (1974). Enzymatische Triglyceridbestimmung nach enzymatischer Spaltung. In: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage. U. Bergmeyer (ed.) Bd. II. p. 1878. Verlag Chemie Weinheim.
- Wang, S.- M. und A.H.C. Huang (1984). Inhibitors of the lipase activities in soybean and other oil seeds. *Plant Physiol.* **76**, 929-934.
- Wang, S., A.H.C. Huang (1987). Biosynthesis of lipase in the scutellum of maize kernels. *J. Biol.Chem.* **262**, 2270-2274.
- Wanner, G. und Theimer R.R. (1978). Membraneous appendices of spherosomes (oleosomes). Possible role in fat utilization in germinating oil seeds. *Planta* **140**, 163-169.
- Wanner, G., H. Formanek und R.R. Theimer (1981). The ontogeny of lipid bodies (spherosomes) in plant cells. *Planta* **151**, 109-123.

- Wanner, G., E.L. Vigil und R.R. Theimer (1982). Ontogeny of microbodies (glyoxysomes) in cotyledons of dark-grown watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) seedlings. *Planta* **156**, 314-325.
- Weber, K. und M. Osborn (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamidegel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
- Wetter, L.R. (1957). Some properties of the lipase present in germinating rape seed. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **34**, 66-70.
- Yamaguchi, T., N. Muroya, M. Isobe und M. Sugiura (1973). Production and properties of lipase from newly isolated *Chromobacterium*. *Agr. Biol. Chem.* **37**, (5), 999-1005.
- Yatsu, L. Y., T.J. Jacks und T.P. Hensarling (1971). Isolation of sphaerosomes. *Plant Physiol.* **48**, 675-682.
- Yatsu, L.Y. und T.J. Jacks (1972). Sphaerosome membranes. *Plant Physiol.* **49**, 937-943.

Am Ende dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. R. R. Theimer für seine wertvollen Anregungen während der Experimente, sein unermüdliches Interesse und seine vielfältigen Ratschläge meinen herzlichen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt auch allen kollegialen Mitarbeitern am Botanischen Institut.

Ebenso danke ich P. Sippli und M. Winkler für Hinweise im Umgang mit der elektronischen Textverarbeitung, R. Klein für die Erstellung der Photographien und W. Heinrichs für die Anfertigung der technischen Zeichnung.

Ganz besonders danke ich meiner Frau und meinen Eltern für die geduldige Anteilnahme.

Lebenslauf

1946	geboren in München am 10. Dezember
1953-1957	Volksschule in München
1957-1966	Gisela-Gymnasium München
1966-1968	Bundeswehr
1969	Beginn des Biologie- und Chemiestudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1973	Zulassungsarbeit bei Prof.Dr.R.R.Theimer
1974	Staatsexamen
1974-1976	Referendarausbildung in Landshut
1976	2. Staatsexamen
seit 1976	Lehrtätigkeit am P. Rupert Mayer Gymnasium Pullach
1981	Beginn der Dissertationsarbeit bei Prof.Dr.R.R.Theimer

